



HAL
open science

Particules ultra-fines et santé : caractérisation des particules ultra-fines dans l'air et dans les tissus humains

Mickaël Rinaldo

► To cite this version:

Mickaël Rinaldo. Particules ultra-fines et santé : caractérisation des particules ultra-fines dans l'air et dans les tissus humains. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0449 . tel-01317966

HAL Id: tel-01317966

<https://theses.hal.science/tel-01317966>

Submitted on 19 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SOCIÉTÉS, POLITIQUE, SANTÉ PUBLIQUE (SP2)

SPÉCIALITÉ SANTÉ PUBLIQUE

Par Mickaël RINALDO

Particules ultrafines et santé :
Caractérisation des particules ultrafines dans l'air et dans les tissus humains

Sous la direction du Pr Patrick BROCHARD

Soutenue le 21 Décembre 2015

Membres du jury :

M. LASFARGUES, Gérard

Mme SOBASZEK, Annie

M. BROCHARD, Patrick

M. GARRIGOU, Alain

M. PAIRON, Jean-Claude

M. DRUET-CABANAC, Michel

Professeur, Université de Paris est Créteil

Professeure, Université de Lille

Professeur, Université de Bordeaux

Professeur, Université de Bordeaux

Professeur, Université de Paris est Créteil

Professeur, Université de Limoges

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Examineur

Président

Membre invité

Avant-propos

Ce mémoire met un point presque final à plusieurs années d'un travail souvent intense, parfois ingrat, mais toujours passionnant qui n'aurait pas été possible sans la longue liste des personnes que je m'appête à remercier en espérant que ceux que j'oublierai ne m'en tiendront pas rigueur.

Tout d'abord, je souhaite remercier tous les membres de mon jury qui ont accepté de me faire l'honneur d'évaluer mon travail malgré le timing serré et la date un peu incongrue. Mme la Pr Sobaszek Annie et Mr le Pr Lasfargues Gérard, je vous suis infiniment reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteurs, étant conscient de la charge que cela représente. Mrs les Pr Alain Garrigou et Jean-Claude Pairon, après avoir été votre élève au cours d'ergonomie du CNAM ou au master Toxicologie Environnement Santé, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos cotés et vous remercie vivement de votre implication dans certaines des phases de ce travail. Mr le Pr Michel Druet-Cabanac, je vous remercie d'avoir accepté pour la deuxième (et dernière fois) d'être dans mon jury de thèse.

Je remercie également le Dr. Jorge Boczkowski, les Pr Marthan Roger et Mollimard Mathieu qui ont accepté d'évaluer mon travail lors des comités de suivi de thèse.

Je tiens ensuite à remercier celui sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Patrick, plus qu'un directeur de thèse et un chef, vous avez été et êtes encore un modèle et un mentor qui a guidé le choix de ma spécialité médicale et mon intérêt pour la toxicologie des particules. Les mots sont insuffisants pour vous témoigner ma reconnaissance pour votre investissement dans ce travail au fil des années et des rendez-vous (très) tardifs ou dominicaux. Je vous remercie d'avoir été là même dans les moments les plus difficiles et de m'avoir empêché de si nombreuses fois de baisser les bras même après mon évasion en terre helvétique.

Si je devais citer une deuxième personne sans qui tout cela n'aurait pas été possible, je te citerais toi, bien sur, Cécile et ta faculté à faire des petits miracles plusieurs fois par jour et même ces dernières semaines. Merci beaucoup pour tout. Merci à toi aussi, Cristel pour ton aide, ton soutien et surtout tes talents de dénicheuse d'articles.

Je remercie également mes formateurs à l'analyse des échantillons en microscopie électronique, Xavier Janson du LEPI et Michel Martineau de l'ancien CREMEM qui ont su faire preuve d'une patience sans faille malgré ma tendance à provoquer les pannes même à distance. J'en profite également pour remercier l'ensemble du personnel de ces deux laboratoires, et particulièrement Laurent Martinon, Marie –Annick Billon-Galland du LEPI et

Elisabeth Sellier pour leur support scientifique et amical et également toute l'équipe du Bordeaux Imaging Center.

Un grand merci aux médecins du travail de la Ratp et notamment au Dr Bounga Bona, aux travailleurs et personnel d'encadrement de cette entreprise, au Dr Mohammed-Brahim de l'ASTI et à Pierrick Pasquereau qui ont rendu encore plus passionnante la partie souterraine de cette aventure.

Cette liste ne serait pas complète sans tous mes anciens collègues du service de médecine du travail (merci particulièrement à toi Catherine pour ton soutien pendant toutes ces années et aux ex « brochardiens » que sont Magalie, Capucine et Thomas), au trio de secrétaires de choc : Hayette, Laurence et Malika, à la joyeuse équipe du bâtiment D et à toute l'équipe Santé Travail Environnement. Merci notamment à toi Sabyne pour tes talents d'expertise et à toi, Aude pour ton support méthodologique toujours pertinent et réactif. Mireille et Ghislaine, merci pour vos conseils avisés et vos talents de relectrices. Merci également à mes nouveaux collègues de l'IST avec qui j'ai beaucoup de plaisir à travailler depuis déjà plus d'un an.

Je remercie également le CHU de Bordeaux, le conseil régional d'Aquitaine et l'Anses qui ont permis ce travail par leur financement.

Je termine enfin, last but not least, par mes proches à qui je dédie ce mémoire. A ma famille qui m'a soutenu durant ces cinq années, ma mère, mon beau père, mes sœurs : Michelle, Mitchelle et Mickéla, mon futur beau-frère Florent qui ont fini par croire que je serai un étudiant à vie... Et surtout à toi, Anne-sarah qui a été mon « potomitan » en 2015 et que j'ai un peu délaissée ces dernières semaines... A mon tour de prendre en charge tous les aspects logistiques de notre petite vie fribourgeoise pour te soutenir dans tes nouvelles fonctions d'enseignante-étudiante !

Les travaux réalisés dans le cadre de l'étude Nanotrans ont été financés par l'Anses (EST 09-85), le CHU de Bordeaux et le conseil régional d'Aquitaine (convention 201013010007)

Titre : Particules ultrafines et santé : Caractérisation des particules ultrafines dans l'air et dans les tissus humains.

Résumé : Les études épidémiologiques sur les effets de la fraction ultrafine de la pollution particulaire et les études sur la toxicité *in vitro* et *in vivo* des nanoparticules manufacturées témoignent d'un danger potentiel pour l'homme en raison de nouvelles propriétés physico-chimiques de la matière à l'échelle nanométrique. L'évaluation du risque lié à des expositions professionnelles ou environnementales ou le diagnostic d'un lien causal entre ces expositions et d'éventuelles pathologies peuvent être limités par l'absence de méthode de référence pour caractériser et quantifier les particules nanométriques dans les tissus et fluides biologiques. Ce travail a permis de mettre au point une méthode remplissant ces objectifs, basée sur la préparation des échantillons par digestion alcaline et microfiltration et sur l'analyse en microscopie électronique analytique. L'application de cette méthode dans deux études a permis de confirmer qu'une translocation des particules nanométriques était possible d'une part au niveau pleural avec concentration dans les black spots et d'autre part à travers le placenta avec une possible exposition du fœtus. Ce travail a également permis de caractériser des sources d'expositions professionnelles ou environnementales aux particules nanométriques. Sous réserve d'optimiser le coût et le temps nécessaire pour ce type d'analyse, cette méthode pourrait permettre de définir des valeurs de référence sur des échantillons plus larges et représentatifs de la population générale ou être utilisée dans le cadre de la surveillance de travailleurs exposés.

Mots clés : Particules ultrafines, nanoparticules, biométrie, métrologie, microscopie électronique à transmission, translocation.

Title: Ultrafine particles and health: Characterization of ultrafine particles in air and human tissues.

Abstract: Epidemiologic studies on the health effects of ultrafine particles from atmospheric pollution and *in vitro* or *in vivo* studies on manufactured nanoparticles toxicity suggest that potential hazards may result from new physico-chemical properties of materials at nanometric scale. To assess human health risk after occupational or environmental exposure or to demonstrate a causal relationship between such exposures and diseases may be hindered by the lack of reference method to characterize and quantify nanometric particles in biological tissues and fluids. This work allowed us to develop such a method based on samples preparation by alkaline digestion and microfiltration followed by analytical electron microscopy analysis. This method applied in two studies allowed us to confirm that pleural translocation of nanometric particles and accumulation in black spots were possible in human and that they also may pass through the placental barrier with potential fetal exposure. This work also allowed us to characterize some sources of occupational and environmental exposures. After time-cost optimization of this method, it could be used to define reference values on larger population-representative samples or used for the medical follow-up of exposed workers.

Keywords : Nanoparticles, ultrafine particles, biological monitoring, metrology, transmission electron microscopy, translocation.

Unité de recherche

Equipe Santé Travail Environnement, ISPED - Centre INSERM U897.
Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat Case 11 33076 BORDEAUX CEDEX France

Sommaire

Sommaire	7
Abréviations	11
Liste des tableaux	12
Listes des figures	14
Introduction	17
Chapitre 1: Revue de la littérature et mise au point d'une méthode de biométrie des particules fines et ultrafines en microscopie électronique	19
1. Revue de la littérature : contexte et état des connaissances	20
1.1. Méthodes utilisées pour caractériser ou quantifier les NP <i>in vivo</i>	21
1.1.1. Méthodes d'imagerie indirecte	22
1.1.2. Méthodes d'imagerie directe	24
1.1.3. Les méthodes quantitatives	25
1.2. État des connaissances sur la toxicocinétique des NP inhalées	26
1.2.1. Absorption	27
1.2.2. Distribution	31
1.2.3. Excrétion	41
1.3. Perspectives dans la biométrie des expositions aux NP	43
1.3.1. Quels sont les besoins ?	43
1.3.2. Quels sont les outils disponibles ?	45
1.3.3. Quels échantillons ?	46
1.3.4. Quelles sont les premières données disponibles ?	47
1.4. Conclusion	52
2. Mise au point de la méthode d'analyse	53
2.1. Protocole initial	53
2.2. Mise au point de la méthode de digestion	56
2.2.1. Revue de la littérature sur les méthodes de digestion existantes	56
2.2.2. Tests de digestion	58
2.3. Tests de filtration	60
2.3.1. Justification - Objectif général	60
2.3.2. Test n°1 : Evaluation des pertes en fonction de la porosité des filtres	60
2.3.3. Test n°2 : Evaluation des pertes en fonction du temps d'évaporation de carbone	63

2.3.4.	Test n°3 : Test de filtration en suspension dans du digestat	63
2.3.5.	Synthèse des tests de filtration	65
2.4.	Tests d’ultracentrifugation	66
2.4.1.	Matériel et méthodes utilisés lors des tests d’ultracentrifugation	66
2.4.2.	Test n°1 : Tests préliminaires sur des NP d’or	67
2.4.3.	Test n°2 : Tests préliminaires sur des NP carbonées	70
2.4.4.	Test n°3 : Mise au point d’un protocole d’analyse d’échantillons urinaires	73
2.4.5.	Test n°4: Ultracentrifugation de suspensions de NP dans le digestat	76
2.4.1.	Synthèse des résultats des tests de centrifugation	81
2.5.	Mise au point du protocole d’analyse en microscopie électronique	82
2.5.1.	Protocole initial	82
2.5.2.	Mise au point du protocole	84
2.5.3.	Test de faisabilité sur six patients	84
2.6.	Protocole d’analyse NANOTRANS	87
2.6.1.	Protocole de préparation des échantillons	87
2.6.2.	Protocole d’analyse en MET	89
2.7.	Validation du protocole Nanotrans par des tests d’inter comparaison	92
2.7.1.	Description du panel	92
2.7.2.	Evaluation de la variabilité inter opérateur lors du contourage	93
2.7.3.	Evaluation de la variabilité pour le classement des particules et l’interprétation des analyses des spectres EDX	94
 Chapitre 2 : Analyse des particules ultrafines dans les tissus humains : Etude Nanotrans		97
1. Introduction - Objectifs		98
2. Etude Foetopuf : analyse de la rétention en PUF du tissu pulmonaire foetal		99
2.1.	Contexte	99
2.2.	Objectifs	100
2.3.	Matériel et méthodes	100
2.3.1.	Inclusion des patientes	100
2.3.2.	Analyse des échantillons en microscopie électronique	102
2.3.3.	Evaluation des expositions maternelles aux particules ultrafines	102
2.3.4.	Analyses statistiques	103
2.4.	Résultats	104
2.4.1.	Données médicales et données d’exposition	104
2.4.2.	Résultats des analyses en MET	106
2.4.3.	Recherche d’une corrélation entre rétention en particules, données médicales et données d’exposition maternelles	111
2.5.	Discussion	114
2.6.	Conclusion	117

3. Etude de la rétention pulmonaire et pleurale en particules fines et ultrafines	118
3.1. Matériel et méthodes	118
3.1.1. La population	118
3.1.2. Préparation des échantillons	119
3.1.3. Analyse en MET	120
3.1.4. Analyses statistiques	121
3.2. Résultats	121
3.2.1. Patients	121
3.2.2. Concentrations en particules	122
3.2.3. Composition chimique des particules	125
3.2.4. Analyses statistiques	129
3.3. Discussion	129
3.4. Conclusion	133
Chapitre 3 : Caractérisation des particules nanométriques dans l'air	134
1. Introduction	135
2. Caractérisation des expositions professionnelles aux particules émises dans le cadre d'un chantier de réfection de rail par meulage dans le métro parisien	136
2.1. Contexte	136
2.2. Matériel et méthodes	137
2.2.1. Description du process	137
2.2.2. Evaluation de l'exposition aux agents chimiques	139
2.2.3. Caractérisation des émissions de particules fines et ultrafines	141
2.2.4. Caractérisation de l'intensité physique	142
2.3. Résultats	143
2.3.1. Exposition des travailleurs aux agents chimiques	143
2.3.2. Caractérisation des particules fines et ultrafines	146
2.3.3. Caractérisation de l'intensité physique	152
2.4. Discussion	153
2.5. Conclusion	157
3. Caractérisation des émissions de particules ultrafines dans la fumée de tabac	158
3.1. Objectifs	158
3.2. Matériel et méthode	158
3.2.1. Caractérisation des particules contenues dans la fumée de tabac	158
3.2.2. Protocole d'analyse des échantillons pulmonaires de souris	160
3.3. Résultats préliminaires	161
3.3.1. Concentration en particules	161
3.3.2. Analyse en MET	161

3.4. Conclusions	163
Conclusions et perspectives	164
1. Synthèse des résultats obtenus	164
2. Limites de la méthode d'analyse et des études réalisées	167
3. Perspectives	169
Bibliographie	171
Annexes	189
1. Annexe 1 : Mode opératoire LEPI	190
2. Annexe 2 : Extrait du portfolio Nanotrans	195
3. Annexe 3 : Questionnaire Foetopuf	199
4. Annexe 4 : Liste des communications et publications associées à la thèse	200
5. Annexe 5 : Publications associées à la thèse	202

Abréviations

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BIC : Bordeaux Imaging Center (Université de Bordeaux)

CPC: Compteur de particules à condensation

CREMEM-PLACAMAT : Centre de REssource Commun en Microscopie Electronique et Microanalyse (Université de Bordeaux)

EDX : Spectroscopie par dispersion d'énergie des rayons X

EGA-FID: Evolved Gas Analysis with Flame Ionization Detection (Analyse thermique évolutive avec détecteur à ionisation de flamme)

GC-FID: Gas Chromatography Flame Ionization Detection (Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme)

HAP: Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HPLC-DAD : High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector (Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur UV à barrette de diodes)

HPLC-Fluo: HPLC with Fluorescence Detector (Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur de fluorescence)

ICP/AES: Spectrométrie d'émission optique par torche à plasma

ICP/MS: Spectrométrie de masse par torche à plasma

IMG : Interruption médicale de grossesse

INAA: Analyse par activation neutronique

LBA : Liquide broncho-alvéolaire

LEPI : Laboratoire d'Etude des Particules Inhalées de la ville de Paris

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

NP : Nanoparticules

NTC : Nanotube de carbone

PH : poids humide

PM : Particulate matter

PS : poids sec

PUF : Particules ultrafines

RPM : Round per minute (tour par minute)

SMRI: Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique

TEMP : Tomographie d'Emission Monophotonique

TEP : Tomographie par Emission de Positron

VLE : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle

Liste des tableaux

Tableau 1: Synthèse des caractéristiques des protocoles des 41 publications analysées.	36
Tableau 2: Synthèse des résultats des 41 publications analysées.....	40
Tableau 3 : Synthèse des publications se rapportant à l'identification et à la quantification des NP dans les tissus et à leur translocation extra pulmonaire chez l'homme.	51
Tableau 4: Synthèse de la revue de la littérature des différentes techniques de préparation d'échantillons biologiques pour l'analyse de particules.	57
Tableau 5: Synthèse des résultats des tests de digestion réalisés sur des échantillons de plèvre et de black spots.	59
Tableau 6 : Résultats du test de filtration n°1	62
Tableau 7: Taux de perte en NP en fonction du degré d'évaporation de carbone	63
Tableau 8 : Résultats du test de filtration n°3, taux de perte en fonction de la méthode de préparation.....	65
Tableau 9 : Synthèse des tests de filtration.	66
Tableau 10: Synthèse du premier test d'ultracentrifugation	70
Tableau 11 : Résultats du test d'ultracentrifugation sur des suspensions de NP de carbone ...	73
Tableau 12: Composition des 6 suspensions du test de centrifugation n°4	77
Tableau 13 : Synthèse des tests de centrifugation.....	81
Tableau 14 : Concentration en particules des échantillons analysés lors du test de faisabilité.	86
Tableau 15 : Concentration en particules exprimée en surface développée par unité de poids sec (mm^2/g) lors du test de faisabilité	87
Tableau 16: Synthèse des données médicales et d'exposition	104
Tableau 17 : Synthèse de la composition chimique des particules retrouvées dans les échantillons pulmonaires fœtaux.....	108
Tableau 18 : Coefficients de corrélation gamma entre les concentrations numériques en particules des échantillons fœtaux et les données médicales ou d'exposition maternelle.	112
Tableau 19: Coefficients de corrélation gamma entre les surfaces développées de particules des échantillons fœtaux et les données médicales ou d'exposition maternelle.....	112

Tableau 20 : Comparaison de la concentration moyenne en particules dans les échantillons fœtaux en fonction du statut tabagique maternel.	113
Tableau 21 : Comparaison des concentrations en particules en fonction de l'exposition environnementale maternelle.	113
Tableau 22 : Comparaison des concentrations en particules en fonction de l'exposition environnementale maternelle et de l'exposition maternelle à la fumée de tabac.	114
Tableau 23: Modalités du calcul du score de black spot.....	119
Tableau 24: Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude.....	122
Tableau 25 : Concentrations et caractéristiques des particules observées dans les différents échantillons.....	125
Tableau 26 : Coefficient Gamma pour les analyses de corrélation effectuées entre les concentrations en particules des échantillons de poumon et de plèvre anthracosique et entre les concentrations en particules des échantillons de poumon et les scores de black spots. ...	129
Tableau 27 : Méthodes utilisées pour les métrologies et limites de quantification correspondantes.	140
Tableau 28 a et b : Critères d'établissement du score d'intensité physique.....	143
Tableau 29 : Synthèse des résultats de l'évaluation des expositions professionnelles aux agents chimiques particuliers	144
Tableau 30: Comparaison des résultats pondérés sur 8h aux valeurs moyennes d'exposition au poste de travail.	145
Tableau 31 : Détails de l'échantillonnage pour les analyses en MET.	148

Listes des figures

Figure 1: Synthèse des méthodes utilisées dans les études de toxicocinétique des nanoparticules	22
Figure 2: Synthèse des résultats des 41 publications analysées. Chaque point noir représente un résultat positif, chaque points gris représente un résultat négatif.	41
Figure 3 : Schémas récapitulatif des données issues des études de toxicocinétique des nanoparticules.....	43
Figure 4 : Synthèse des caractéristiques de la méthode LEPI pour les analyses minéralogiques de tissus et fluides biologiques et synthèse des tests réalisés pour l'adapter aux NP.	54
Figure 5 : Transfert des particules sur une grille de MET par la méthode du laveur de Jaffe .	55
Figure 6 : Répartition des NP d'or de 20 et 60 nm de diamètre sur un filtre de 200 nm de porosité.....	62
Figure 7 : Schémas récapitulatif des protocoles d'ultracentrifugation.....	69
Figure 8 : Aspect des agrégats de NP de Carbon Black en MET avant et après centrifugation (x 30000).	72
Figure 9 : Aspect en MET à grossissement x 30000 de la suspension C (flèches noires : particules minérales cristallines, flèches blanches : nanoparticules)	75
Figure 10 : Résultats du test d'ultracentrifugation n°3	76
Figure 11: Micrographie en MET à grossissement x 30000 d'une microgoutte de la suspension de NP d'or et de noir de carbone dans le digestat après centrifugation.	79
Figure 12 a et b: Résultats du test de centrifugation n°4.....	80
Figure 13 : Exemple de spectre EDX réalisé sur un filtre sans particule.....	83
Figure 14 : Aspect caractéristique de particules ultrafines d'aluminium retrouvées dans un échantillon pulmonaire de soudeur	85
Figure 15 : Comparaison des protocoles LEPI et Nanotrans.	92
Figure 16: Estimation de la surface développée en nm ² sur quatre photos.....	94
Figure 17 : Diagramme en radar des réponses du panel pour l'attribution d'une classe de composition chimique en fonction de l'aspect des NP.	95

Figure 18 : Diagramme en radar des réponses du panel pour l'attribution d'une classe de composition chimique en fonction du spectre d'analyse EDX.	96
Figure 19: Répartition (en %) de l'occupation des sols autour du domicile des patientes incluses dans l'étude.....	106
Figure 20: Répartition des échantillons en fonction de leur concentration numérique en particules.	107
Figure 21: Synthèse de la composition chimique des particules retrouvées dans les échantillons pulmonaires fœtaux.....	109
Figure 22: Micrographie et spectre EDX : A) d'un agrégat carboné (x 30000), B) d'une particule isolée d'alliage Fe, Cr, Ni (acier inox) (x 60000), C) d'un agrégat de cérium (x80000).	110
Figure 23: Micrographies de nanoparticules de fer exogène (A) and endogène (B) et spectres EDX associés.....	111
Figure 24: Aspect macroscopique des échantillons de parenchyme, plèvre saine et anthracosique et exemples de micrographies de ces tissus issues du même sujet.	123
Figure 25: Concentration en particules en fonction du type d'échantillons. Les sujets sont rangés par ordre décroissant de concentration pulmonaire.	124
Figure 26: Composition des particules en fonction de leur taille.....	126
Figure 27: Composition chimique des particules minérales	127
Figure 28 : Composition chimique des particules métalliques	128
Figure 29: Micrographie et spectre EDX d'un agrégat de a) carbone (x 25000) b) titane (x 30000).....	128 p
Figure 30 : Evolution de la concentration en particules dans l'air durant les deux nuits de chantier de maintenance par meulage Octobre 2011.	147
Figure 31 : Deux exemples de micrographie en MET d'agrégats de carbone et spectres EDX associés (a: x5000, b: x20000)	150
Figure 32 : Micrographies MEB d'échantillons de scories et spectre EDX associé (micrographie principale: x4000, zoom: x20000).....	151
Figure 33: Niveau d'intensité physique moyenne pour les contrôleurs voies et meulage.	152
Figure 34 : Machine à fumer du laboratoire Inserm U955. Université Paris Est Créteil.....	159

Figure 35 : Micrographies d'agrégats de particules ultrafines de carbone retrouvés dans les échantillons de fumée de tabac et dans le parenchyme pulmonaire de souris exposées à la fumée de tabac..... 162

Introduction

Les données actuelles de la littérature témoignent d'une toxicité particulière des particules de taille nanométrique tant du point de vue expérimental que du point de vue épidémiologique.

Ces données indiquent qu'une exposition respiratoire à ce type de particule est susceptible d'induire un stress oxydant ou une cascade pro-inflammatoire voire des effets génotoxiques et cancérigènes. Ces effets peuvent se manifester au niveau de la porte d'entrée (effets pulmonaires locaux) mais également au niveau des organes périphériques (effets systémiques).

Ces effets systémiques peuvent concerner différents organes tels que les appareils cardio-circulatoires, le système nerveux central ou le système immunitaire.

De nombreuses études expérimentales ont également démontré que certaines particules de taille nanométrique ont des propriétés de translocation à travers les membranes et les barrières biologiques (barrière alvéolo-capillaire, barrière digestive, barrière hémato-encéphalique, barrière placentaire) qui pourraient expliquer une partie des effets systémiques.

Il existe peu de données humaines sur la toxicocinétique des nanoparticules (NP) et des particules ultrafines (PUF). Elles reposent principalement sur des méthodes d'analyse indirectes (particules radio-marquées ou fluorescentes, analyses élémentaires globales).

Dans la mesure où il n'existe aucune méthode de référence validée pour la préparation et l'analyse de tissus ou de fluides biologiques en vue de la caractérisation et de la quantification des NP, il existe également très peu de données humaines sur la rétention des particules nanométriques dans le poumon ou les organes périphériques.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de mettre au point une méthode d'analyse des particules nanométriques dans les tissus et fluides biologiques humains reposant sur la microscopie électronique à transmission (MET) ce qui fera l'objet de la première partie de ce manuscrit. La validation de la méthode a reposé sur l'analyse de deux séries d'échantillons dans le cadre de l'étude Nanotrans. Les résultats de ces études visant à analyser la translocation placentaire et pleurale des particules ultrafines seront présentés dans la deuxième partie. Compte tenu du peu de données sur l'aspect des NP présentes dans l'air des milieux de travail ou dans l'environnement, l'interprétation des observations réalisées en microscopie

électronique sur les échantillons biologiques a parfois été difficile. Un objectif secondaire est donc apparu, celui d'obtenir des exemples de caractérisation en MET de particules nanométriques provenant de sources environnementales ou professionnelles. Les travaux réalisés dans ce cadre seront présentés dans la troisième partie.

Chapitre 1
Revue de la littérature et mise au point d'une méthode de
biométrie des particules fines et ultrafines en microscopie
électronique

1. Revue de la littérature : contexte et état des connaissances

Les NP sont définies par l'Organisation Internationale de Normalisation comme des particules dont toutes les dimensions sont inférieures à 100 nm (ISO 2007). En raison de leur taille, ces particules ont une déposition pulmonaire plus importante, une surface réactive également plus importante, des propriétés de translocation systémique (HEI 2013) et d'adsorption de substances toxiques qui leur confèrent un potentiel toxique plus important (Kumar et al. 2014; WHO 2013). Cependant, certaines propriétés toxicologiques et biocinétiques spécifiques des NP peuvent se retrouver pour des particules de plus de 100 nm (Kendall and Holgate 2012) et même de plus de 500 nm (Oberdorster, Elder, and Rinderknecht 2009).

Les NP peuvent être manufacturées (NP commerciales) ou produites de façon non intentionnelle (particules ultrafines (PUF)). Les PUF de la pollution atmosphérique proviennent principalement de la combustion des énergies fossiles liée au transport routier (environ 60%), aux autres formes de transport (ferroviaire, maritime, environ 19%) ou aux activités domestiques (environ 13%) (Paasonen et al. 2013). Ces particules diffèrent des premières par leur diamètre poly-dispersé et par une composition chimique plus complexe (Bakand, Hayes, and Dechsakulthorn 2012).

Cependant pour ces deux types de particules nanométriques, des effets et des mécanismes toxicologiques similaires ont été rapportés (Oberdorster et al. 2004) et des outils similaires peuvent être utilisés pour les mesurer et les caractériser dans les milieux de travail ou dans les tissus. Ainsi, dans ce manuscrit, le terme NP sera utilisé pour parler des particules de taille nanométrique indépendamment de leur origine ou de leur état d'agrégation conformément aux recommandations de la commission européenne pour la définition des nanomatériaux (EU 2011).

Chez l'homme, la toxicité de la fraction ultrafine de la pollution atmosphérique a été suggérée par les études épidémiologiques qui ont démontré un lien avec des pathologies pulmonaires (infections broncho-pulmonaires, asthme, bronchite chronique obstructive, cancer) ou la morbi-mortalité cardiovasculaire (Kendall and Holgate 2012; Ostiguy et al. 2006b; Yang, Peters, and Williams 2008). La toxicité particulière des NP a largement été démontrée dans les études expérimentales incluant des effets respiratoires (Andujar et al. 2011) mais également extra-pulmonaires notamment cardiovasculaires, neurologiques ou immunitaires

(Ostiguy et al. 2006b). La question de savoir si ces effets extra-pulmonaires peuvent être liés à une translocation systémique n'est en revanche pas clairement tranchée (Kendall and Holgate 2012; Landsiedel et al. 2012). En effet, ils peuvent aussi, par exemple, être liés à la diffusion et à la toxicité de la fraction soluble des particules ce qui a été démontré chez le rat pour des NP issues de la combustion (Wallenborn et al. 2007).

La toxicocinétique des NP est un champ particulièrement étudié dans le cadre des études de nanotoxicologie mais également dans le cadre du développement intense des nanotechnologies dans un but médical (Arvizo, Bhattacharya, and Mukherjee 2010; Card et al. 2008; Sa et al. 2012). Les méthodes et les résultats de ces études peuvent être utiles pour mettre au point des méthodes de biométrie des NP utilisables pour l'évaluation d'expositions environnementales ou professionnelles ou dans le cadre du diagnostic d'éventuelles pathologies provoquées par ces expositions.

1.1. Méthodes utilisées pour caractériser ou quantifier les NP *in vivo*

Pour pouvoir être utilisée dans les études de toxicocinétique des NP, une méthode d'analyse doit avoir une sensibilité analytique importante, un bruit de fond faible et être adaptée à des concentrations de plusieurs ordres de grandeurs différents (Kreyling et al. 2013). Une synthèse des méthodes habituellement utilisées dans ces études est présentée dans la Figure 1.

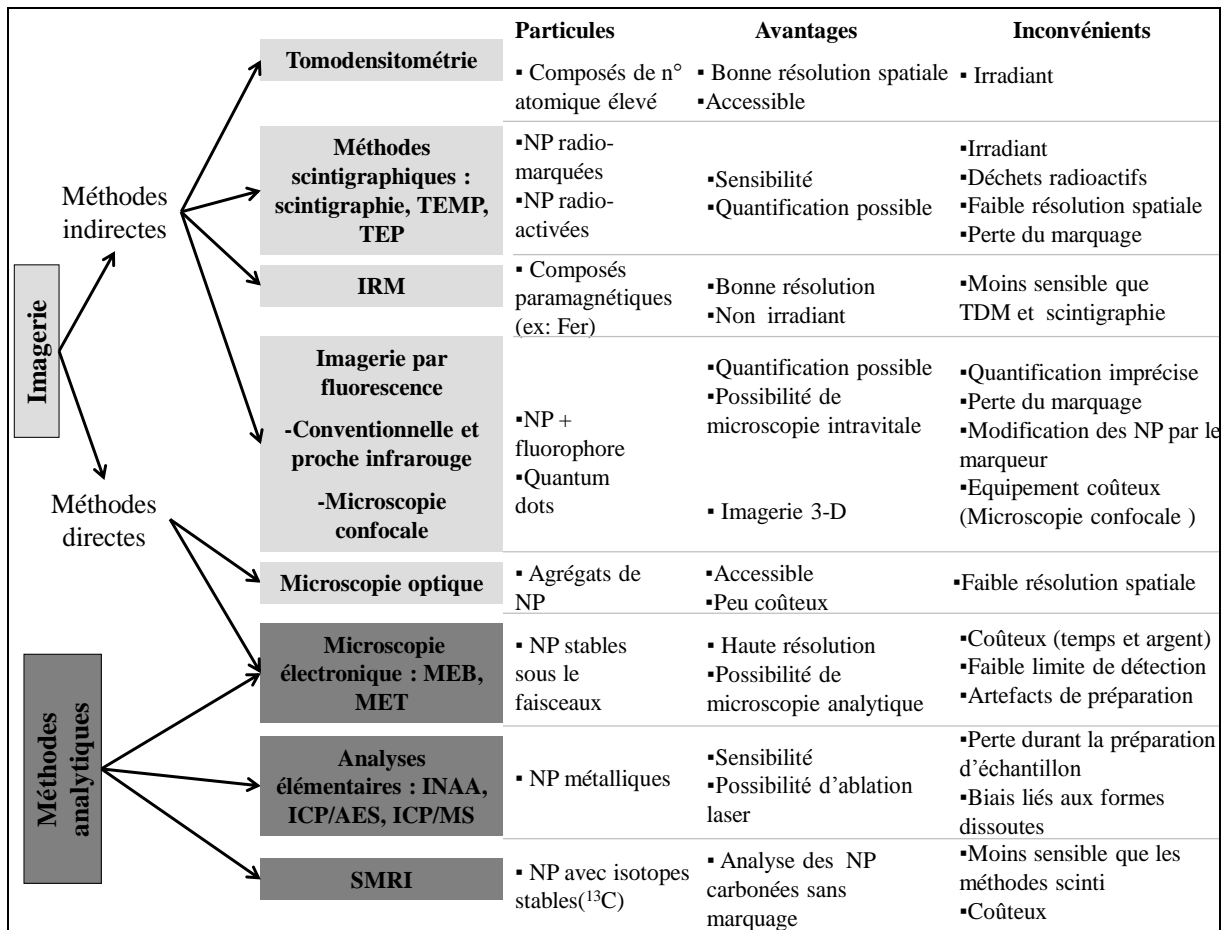


Figure 1: Synthèse des méthodes utilisées dans les études de toxicocinétique des nanoparticules (TEP : Tomographie par émission de positron, TEMP : tomographie d'émission monophotonique, INAA: analyse par activation neutronique, ICP/MS: Spectrométrie de masse par torche à plasma, ICP/AES: Spectrométrie d'émission optique par torche à plasma, SMRI: Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique)

1.1.1. Méthodes d'imagerie indirecte

Différentes méthodes d'imagerie ont pu être utilisées dans le cadre des études de toxicocinétique des NP :

- **les méthodes scintigraphiques et de radio-spectrométrie** qui reposent sur la mesure des émissions radioactives de NP marquées par des radio-isotopes durant leur fabrication (exemple de marqueurs : Technétium (Nemmar et al. 2002), Iridium (Kreyling et al. 2009) ou Indium (Singh et al. 2006)). Les NP métalliques peuvent aussi être radio-activées par bombardement avec un faisceau de neutrons, protons ou d'ions, technique

notamment utilisée pour les NP d'or (Geiser and Kreyling 2010). Cette technique permet d'éviter les biais d'interprétation liés à la dissociation du marquage des NP (Kreyling et al. 2013). Les méthodes scintigraphiques sont indispensables dans l'étude des particules carbonées *in vivo* compte tenu du bruit de fond lié au carbone biologique qui rend inutilisables les méthodes analytiques habituelles (Wang et al. 2013). La mesure de la radioactivité permet à la fois d'obtenir des données d'imagerie et des données quantitatives par l'utilisation de gamma-caméras. Les biais d'estimation liés à la projection 2-D en scintigraphie gamma (par exemple en raison du chevauchement de voies aériennes respiratoires) peuvent être évités par l'utilisation de la tomographie d'émission monophotonique ou encore par la tomodensitométrie par émission de positrons en utilisant des émetteurs de positrons tels que le ^{11}C . Ces techniques permettent d'obtenir une imagerie tridimensionnelle avec cependant une faible résolution spatiale (Carvalho, Peters, and Williams 2011),

- **la tomodensitométrie** : elle permet une meilleure résolution spatiale et est applicable dans l'étude de NP fabriquées à partir de matériaux de haut numéro atomique qui ont donc un coefficient d'absorption élevé tels que l'or ou de NP marquées avec des agents de contraste tels que l'iode (Roller et al. 2011),
- **l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)** qui a notamment déjà été utilisée pour évaluer la déposition pulmonaire de NP d'oxyde de fer (Carvalho, Peters, and Williams 2011) ou étudier des nanotubes de carbone en utilisant les propriétés magnétiques de leurs impuretés métalliques (Al Faraj et al. 2009). Cette méthode a l'avantage de n'être ni invasive ni irradiante mais requiert un équipement coûteux et est moins sensible que les méthodes scintigraphiques ou les méthodes reposant sur la fluorescence (Roller et al. 2011),
- **les méthodes d'imagerie microscopique par fluorescence**. L'imagerie par fluorescence nécessite d'utiliser un fluorophore pour marquer des particules telles que des particules de polystyrène (Furuyama et al. 2009), d'oxyde de fer (Almeida et al. 2011)) ou en utilisant des NP naturellement fluorescentes comme les quantum dots (Burns et al. 2009). Une amélioration de la technique repose sur l'utilisation de la fluorescence proche infrarouge qui peut traverser plusieurs cm de tissus vivants ce qui permet des études *in vivo* (Roller et al. 2011) et améliore les analyses quantitatives (Burns et al. 2009). Ces

méthodes peuvent également être utilisées couplées avec la microscopie intra vitale pour produire des images de la distribution pulmonaire des NP *in vivo* (Roller et al. 2011) ou la microscopie confocale pour produire des images 3-D avec une meilleure résolution.

En raison de l'absorption par les tissus ou de la dispersion des photons, les méthodes reposant sur la fluorescence sont moins adaptées à des analyses quantitatives que les méthodes basées sur la radioactivité (Liu, Tseng, and Huang 2012). De plus le marquage par un fluorophore peut modifier les propriétés physicochimiques des NP (taille, charge) et modifier leur biodistribution (Almeida et al. 2011).

Dans les méthodes reposant sur un marquage radioactif ou fluorescent, il est nécessaire que la dissociation du marqueur des NP soit évaluée par des tests de dissolution dans des conditions proches des conditions tissulaires (Elder et al. 2006; Zhu et al. 2009) ou par des méthodes de chromatographie telles que la chromatographie sur couche mince (Nemmar et al. 2002) ou la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Choi et al. 2007).

1.1.2. Méthodes d'imagerie directe

Ces méthodes reposant sur la visualisation directe des particules comprennent :

- **les techniques de microscopie optique.** La **microscopie optique conventionnelle** est rapide et peu coûteuse mais ne permet la détection de NP que sous la forme d'agrégats compte tenu d'une résolution maximale de 200 nm. **Les techniques de microscopie optique en champs proche** ont une meilleure résolution d'environ 50 nm mais nécessite un matériel coûteux. Ces méthodes peuvent être associées à d'autres méthodes telles que l'IRM, la TDM le TEP Scan : ce sont les techniques d'imagerie multimodales (Park et al. 2012),
- **les techniques de microscopie électronique à transmission ou à balayage.** Elles ont des résolutions inférieures au nm et sont des techniques plus adaptées à la caractérisation et la localisation des NP dans les tissus et fluides biologiques. De plus les méthodes de microscopie électronique analytique obtenues par couplage des MET ou MEB avec des spectromètres de perte d'énergie des électrons ou des spectromètres de dispersion des rayons X (EDX) permettent de déterminer la composition élémentaire des particules en éléments plus lourds que le béryllium. Ces méthodes de haute résolution sont à l'heure

actuelle encore indispensables pour caractériser la distribution granulométrique, la morphologie, la structure mais aussi la composition chimique de nanomatériaux notamment dans des conditions *in vivo* dans les études de toxicologie (Bakand, Hayes, and Dechsakulthorn 2012).

Les méthodes de microscopie électronique présentent cependant certaines limites telles que :

- les artefacts liés à la préparation des échantillons permettant de les soumettre au vide poussé nécessaire en microscopie électronique (Tiede et al. 2008),
- leur limite de détection basse qui les rend difficilement utilisables dans les études de translocation reposant sur des coupes fines d'organes périphériques dans lesquelles la concentration en particule peut être inférieure à 1 particule par mm^2 (Tsutsumi and Yoshioka 2011),
- les biais liés à l'absence de visualisation des structures transparentes aux électrons comme par exemple des polymères servant à enrober les NP (Choi et al. 2010).

Probablement en raison de ces limites, il n'existe pas d'étude reposant sur la microscopie électronique pour quantifier les NP dans des échantillons biologiques (Hagens et al. 2007).

1.1.3. Les méthodes quantitatives

En dehors des méthodes basées sur des traceurs radioactifs, la quantification des NP dans les études de toxicocinétique des NP repose habituellement sur des méthodes d'analyse élémentaire telles que: **l'analyse par activation neutronique (INAA), la spectrométrie de masse par torche à plasma (ICP/MS), la spectrométrie d'émission optique par torche à plasma (ICP/AES)**, (Khlebtsov and Dykman 2011). La quantification précise des NP par ces méthodes peut se heurter à plusieurs limites :

- l'interprétation peut être rendue difficile si le bruit de fond de l'élément étudié est important en milieu biologique (exemple du fer) (Kreyling et al. 2013),
- les pertes ou les contaminations possibles pendant la préparation des échantillons,
- les biais d'interprétation liés à la détection des éléments sous forme ionisée après dissolution des NP (Geiser and Kreyling 2010). En effet de nombreuses NP sont solubles dans les conditions physiologiques (NP d'argent, de cuivre, de zinc, d'oxyde de fer, de quantum dot). Certaines particules insolubles (NP d'oxyde de cérium, d'oxyde de titane,

d'oxyde de zirconium et d'or) sont plus adaptées aux études de toxicocinétique (Boyes et al. 2012). Afin de pallier à ce type de biais, l'évaluation de la solubilité des NP nécessite des méthodes spécifiques à ce type de particules (Misra et al. 2012). **La spectroscopie d'absorption des rayons X** peut par exemple être utilisée pour différencier les éléments sous forme particulaire des éléments sous forme ionisée (Baek et al. 2012),

- les analyses élémentaires sont des analyses globales qui ne permettent pas d'étudier la distribution dans les différents compartiments tissulaires (vasculaire, interstitiel, intracellulaire) ce qui peut être crucial par exemple lors de l'étude de la perméabilité de la barrière hémato encéphalique (Boyes et al. 2012; De Jong et al. 2008). Pour éviter les biais d'interprétation, ces méthodes doivent donc être couplées à des méthodes d'imagerie telles que la microscopie électronique permettant de localiser précisément les NP (Deng et al. 2007; Dziendzikowska et al. 2012).

Une méthode très prometteuse est la **single particle-ICPMS** qui permet de différencier les formes particulières des formes ioniques dissoutes et de fournir des informations telles que : la taille, la composition élémentaire, la concentration numérique et la distribution granulométrique de NP dans des échantillons liquides (Laborda, Bolea, and Jimenez-Lamana 2014). Cette technique n'est pour le moment utilisable que pour les particules constituées d'un seul élément chimique à l'exclusion du carbone et de taille supérieure à 20 nm (Laborda, Bolea, and Jimenez-Lamana 2014). Elle a par exemple permis d'étudier des NP d'argent, d'or et de titane dans des digestats de tissus biologiques (Gray et al. 2013; Tassinari et al. 2014; van der Zande et al. 2012).

Les études de toxicocinétique peuvent également être basées sur la détection d'isotopes stables ce qui peut être intéressant pour l'analyse de particules carbonées. Ainsi la détection du ^{13}C dans les particules en utilisant des méthodes telles que la **spectrométrie de masse isotopique** (Wang et al. 2012) ou **les spectromètres de masse par accélération** (Malfatti et al. 2012) peut permettre de les différencier du bruit de fond lié au carbone tissulaire.

1.2. État des connaissances sur la toxicocinétique des NP inhalées

La toxicocinétique des NP dépend non seulement de leurs propriétés physico-chimiques mais également des conditions anatomiques, physiologiques, et physico-chimiques des organes

dans lesquelles elles se déposent, se distribuent et s'éliminent (Almeida et al. 2011). Parmi les propriétés intrinsèques des particules ayant un impact sur leur toxicocinétique on peut citer :

- la taille des NP individuelles mais également celle des agrégats (van Ravenzwaay et al. 2009). Plus les particules sont petites, meilleure est leur biodistribution (Landsiedel et al. 2012) compte tenu d'une demi-vie sanguine plus longue donc une probabilité accrue d'accéder aux organes périphériques (Almeida et al. 2011),
- le degré d'agglomération (Stark 2011),
- la charge de surface : les particules chargées ont une meilleure déposition (Yang, Peters, and Williams 2008) et les particules neutres ont un temps de demi-vie sanguine plus long ce qui favorise leur capture par les organes périphériques (Landsiedel et al. 2012; Li and Huang 2008).

1.2.1. Absorption

1.2.1.1. *Absorption respiratoire*

L'inhalation est la plus documentée et probablement la plus importante des voies d'entrée des NP (Schmid et al. 2009). La déposition pulmonaire des particules dépend des particularités anatomiques régionales, des caractéristiques aérodynamiques des flux d'air et des caractéristiques des aérosols (Bakand, Hayes, and Dechsakulthorn 2012; Carvalho, Peters, and Williams 2011; Kreyling et al. 2013). Parmi ces caractéristiques, l'une des plus importantes est le diamètre aérodynamique des particules. Dans le cas des NP où les mécanismes de diffusion sont prépondérants, le diamètre thermodynamique peut être plus pertinent (Geiser and Kreyling 2010).

Durant l'inhalation, les plus grosses particules (5-30 μm) se déposent dans la région naso-pharyngienne par impaction alors que les particules plus petites (diamètre 1-5 μm) se déposent préférentiellement au niveau trachéo-bronchique par impaction et sédimentation. Compte tenu de leur taille, les NP se déposent préférentiellement par diffusion ou par précipitation électrostatique pour les particules chargées. Elles se déposent également dans ces deux régions respiratoires (naso-pharyngienne, tracheo-bronchique) mais aussi en région alvéolaire. Cette déposition profonde implique une clairance plus lente et une plus grande probabilité d'effets biologiques (Bakand, Hayes, and Dechsakulthorn 2012).

Les modèles mathématiques utilisés par la Commission Internationale de Radioprotection prédisent une déposition de 80 % des NP inhalées dans l'appareil respiratoire (Hagens et al. 2007). Cette déposition est variable en fonction de leur taille et de la région anatomique considérée avec par exemple :

- pour les particules de 1 nm : 90 % de déposition dans la région naso-pharyngienne,
- pour les particules de 5 nm : 30 % de déposition dans chacun des 3 compartiments (naso-pharyngien, trachéo-bronchique, alvéolaire),
- pour les particules de 20 nm : déposition de 15% dans la région nasopharyngienne et trachéo-bronchique et 50 % dans le compartiment alvéolaire (Oberdorster et al. 2004).

Ces données sont valables pour les NP individuelles mais pour les agrégats tels que les particules diesel, les données expérimentales suggèrent que les dépositions totale et alvéolaire sont plus grandes que celles prédites par ces modèles (Broday and Rosenzweig 2011). De plus, ces données ne sont pas valables en cas de pathologie pulmonaire comme une bronchite chronique obstructive qui est associée à une déposition plus importante (Brown, Zeman, and Bennett 2002).

Ces modèles mathématiques peuvent être contredits par les résultats des études expérimentales qui ont par exemple retrouvé des dépositions relatives similaires entre les particules fines et ultrafines (Eydner et al. 2012).

En résumé, dans une revue de la littérature, Schmid et al estiment pour les particules ultrafines une déposition pulmonaire entre 30 et 60 % (Schmid et al. 2009).

Une autre propriété des NP influençant grandement leur biodistribution est leur degré d'agglomération. Les mesures réalisées en milieu de travail montrent que les PUF dans l'air forment des agrégats dont la taille suit une distribution bimodale avec deux pics de diamètre aérodynamique à 200-400 nm et 2000-3000 nm (Boyes et al. 2012). Les études suggèrent qu'après leur déposition, les NP ont encore tendance à s'agglomérer pour former des agrégats de taille plus importante et que la désintégration de ces agrégats (avec une augmentation du nombre de particules et une possible augmentation de la translocation) est peu probable (Creutzenberg et al. 2012). Ces données ont été confirmées par une revue de la littérature sur les NP de noir de carbone dans laquelle Levy *et al* concluent que la désintégration ou la dissociation des agrégats nécessitent des niveaux d'énergie très élevés (tels que ceux obtenus

par des méthodes de sonication) qui ne sont pas obtenus dans les conditions physiologiques (Levy et al. 2012). D'autres auteurs suggèrent au contraire qu'après déposition, une dissociation des agrégats de NP inhalées est possible, modifiant leur biodistribution (Kreyling et al. 2013).

Après leur déposition, les NP sont éliminées soit par des mécanismes chimiques (dissolution) soit par une translocation extra pulmonaire (Oberdorster et al. 2004).

Dans la région alvéolaire, le mécanisme principal pour les particules microniques est la phagocytose par les macrophages alvéolaires. Les particules sont ensuite dissoutes ou sont transportées via le système lymphatique où elles peuvent s'accumuler. Une infime fraction peut revenir dans les voies respiratoires et être drainée par la clairance ciliaire. Ces mécanismes de clairance aboutissent à une demi-vie de 700 jours chez l'Homme pour les particules microniques (Schmid et al. 2009). En raison de mécanismes de reconnaissance et d'internalisation par les cellules phagocytaires moins efficaces la clairance peut être 5 (Schmid et al. 2009) voire 100 fois (Oberdorster et al. 2004) moins efficace pour les NP.

Dans les voies trachéo-bronchiques, les NP sont transportées par l'ascenseur muco-ciliaire jusqu'au larynx où elles sont dégluties dans les voies digestives. Cette clairance rapide élimine les particules de plus de 6 µm en environ 2 jours chez les rongeurs et environ 20 jours chez l'homme (Geiser and Kreyling 2010). Pour les NP, la pénétration entre les espaces péri-ciliaires ou leur déposition dans des zones non recouvertes par du mucus provoquent une rétention à long terme de plus de 80 % de la dose inhalée (Kreyling et al. 2013). Cette rétention explique que les particules puissent être détectées dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) (Geiser and Kreyling 2010).

1.2.1.2. *Absorption digestive*

Les NP qui ont été dégluties peuvent être absorbées au niveau intestinal mais les données scientifiques sont insuffisantes pour déterminer si cette absorption est significative sur le plan toxicologique. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'absorption intestinale des NP:

- absorption par les entérocytes,
- transport para cellulaire (persorption) par les espaces inter entérocytaires,

- capture par les cellules M des plaques de Peyer et transfert dans la circulation lymphatique et sanguine (Oberdorster et al. 2004; O'Hagan 1996). Cette voie est possible pour les particules entre 20 et 250 nm et est particulièrement efficace pour les particules de 50 nm.

Les taux d'absorption intestinale rapportés dans la littérature varient entre 10 et 34% pour les particules de moins de 100 nm avec une importante variabilité interindividuelle (Frohlich and Roblegg 2012). Powell *et al* estiment que l'absorption intestinale quotidienne de particules inorganiques de l'alimentation est d'environ 40 mg/personne, ce qui correspond à une ingestion quotidienne de 10^{12-14} particules (Powell et al. 2010).

Nous avons analysé 16 études expérimentales portant sur l'absorption intestinale des NP (Baek et al. 2012; Cho et al. 2013; Deng et al. 2007; Florence et al. 1995; He et al. 2010; Hillyer and Albrecht 2001; Hirst et al. 2013; Jani et al. 1990; Lee et al. 2012; Li et al. 2012; Loeschner et al. 2011; Lozano et al. 2012; Park et al. 2010; Powell et al. 2010; Wang et al. 2006; Wang et al. 2010). Dans 10 de ces publications, une translocation gastro-intestinale a été suggérée. Cependant, compte tenu de résultats contradictoires avec une grande variation des taux de translocation (de 0,01 à 7%), des biais liés à la dissolution des NP par l'acidité du liquide gastrique, il est difficile de conclure si l'absorption intestinale est un mécanisme significatif pour les NP inhalées. Un seul auteur conclut à une absorption négligeable de NP de cérium après gavage ou instillation intra trachéale. Il conclut également que dans le cas d'une exposition respiratoire, les NP retrouvées dans les selles représentent la totalité des NP dégluties après clairance muco-ciliaire (He et al. 2010).

1.2.1.3. *Autres voies*

Les NP peuvent également être absorbées au niveau du naso-pharynx par les terminaisons dendritiques des neurones olfactifs (Ali et al. 2010). Cette voie qui donne un accès direct au cerveau pourrait concerner 10% des NP inhalées chez le rat (Oberdorster et al. 2004). Ce transfert par des terminaisons nerveuses, possible également via les terminaisons nerveuses bronchiques, a d'abord été démontré chez le rat et le singe (Hagens et al. 2007). Cette voie a été confirmée pour de nombreuses NP telles que les particules d'or colloïdal (50 nm), de carbone (35 nm), de manganèse (30 nm) et d'oxyde de fer (280 nm). Ce passage a pu être

associé à des lésions ou une réponse physiologique du bulbe olfactif et du cerveau (Boyes et al. 2012).

1.2.2. Distribution

1.2.2.1. *Passage dans la circulation sanguine et lymphatique*

Une translocation systémique des NP qui se sont déposées dans le poumon peut se faire à travers l'épithélium ou les terminaisons nerveuses des voies de conduction. Cependant la barrière alvéolo-capillaire en raison de sa surface plus importante et sa faible épaisseur est la voie la plus significative (Landsiedel et al. 2012).

Les NP peuvent passer de l'espace alvéolaire au secteur interstitiel par plusieurs mécanismes :

- transports associés aux protéines pour les NP qui se sont liées aux protéines,
- mécanismes d'endocytose,
- passage direct à travers les jonctions serrées.

Après cette translocation interstitielle, elles peuvent passer à travers les cellules endothéliales dans la circulation systémique (Oberdorster et al. 2004) ou être épurées par les cellules phagocytaires vers la lumière alvéolaire ou bronchique. Bien que la significativité de cette voie chez l'homme soit inconnue, les NP peuvent également être drainées par la circulation lymphatique (Geiser and Kreyling 2010), ce qui rend possible leur présentation aux cellules immunitaires (Riviere 2009). Un autre mécanisme pouvant conduire à un transport lymphatique est la translocation des NP de la lumière alvéolaire à l'espace pleural. En effet, les NP qui sont dans l'espace pleural peuvent être aspirées dans la circulation lymphatique par les stomates de la plèvre pariétale. Au niveau des stomates, les particules peuvent également s'accumuler et former des structures macroscopiques appelées black spot (Donaldson et al. 2010).

Dans le sang, les particules ont tendance à être enrobées par différentes protéines qui favorisent leur internalisation (Kettiger et al. 2013): c'est l'opsonisation. Après cette étape, elles sont rapidement en quelques minutes, éliminées par les cellules du système phagocytaire mononucléé. Les particules qui ne sont pas éliminées peuvent circuler plus longtemps et être plus longtemps disponibles pour être captées par les organes périphériques (Garnett and Kallinteri 2006).

1.2.2.2. *Distribution dans les organes périphériques*

Les NP présentes dans la circulation sanguine doivent traverser l'endothélium vasculaire (extravasation) pour arriver dans les organes périphériques :

- par diffusion à travers les pores vasculaires pour les particules de moins de 5 nm,
- après un transport trans-endothélial plus lent (Choi et al. 2010) par une voie paracellulaire à travers les jonctions serrées (Kettiger et al. 2013) ou par transcytose à travers les cellules endothéliales (Garnett and Kallinteri 2006). Pour certains organes tels que le foie et la rate un passage est également possible à travers les espaces fenêtrés des capillaires.

Les études de toxicocinétique basées sur des administrations intraveineuses ont montré que les organes retenant le plus les NP sont le foie, la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, organes qui contiennent un taux important de cellules du système phagocytaire mononucléaire. Mais d'autres organes capturent également les NP à des concentrations moins importantes comme le poumon, les reins, la peau. Cette capture est rapide en 1 à 2 heures avec une accumulation à long terme possible (un à plusieurs mois) démontrée après une exposition unique (Balasubramanian et al. 2010) ou des expositions répétées (Landsiedel et al. 2012).

Certaines études ont également démontré que les NP sont capables de passer à travers des barrières biologiques telles que la barrière hémato-encéphalique ou placentaire.

Khlebtsov *et al*, en utilisant des administrations parentérales de NP d'or suggèrent un seuil de taille de 20 nm pour la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Khlebtsov and Dykman 2011). Cependant, une revue de la littérature concernant les études d'administration de NP de métal ou d'oxydes métalliques insolubles avec analyse en MET permettant la localisation des NP au niveau tissulaire a montré que la plupart des NP ne traversait pas la barrière hémato-encéphalique ou à des taux infimes. Ces conclusions valables sur le cerveau adulte ne le seraient cependant peut être pas pour le cerveau fœtal (Boyes et al. 2012). Nakane *et al* suggère que la translocation des NP dans le cerveau évoquée par la littérature scientifique serait principalement expliquée par un transport axonal plutôt que par un passage de la barrière hémato-encéphalique (Nakane 2012). Un autre mécanisme possible de

translocation des NP au niveau du cerveau a aussi été évoqué : c'est la translocation de NP dans le liquide céphalorachidien après un transport neuronal ou péri-neural (Oberdorster, Elder, and Rinderknecht 2009).

Une translocation transplacentaire a également été rapportée par de nombreux auteurs se basant sur des modèles :

- in vitro (Saunders 2009),
- de perfusion de placenta humain ex vivo (Wick et al. 2010),
- murins in vivo (Kulvietis et al. 2011; Yamashita et al. 2011) dans lesquels des effets délétères cérébraux ont été démontrés chez le fœtus (Takeda et al. 2009).

Afin de synthétiser les données publiées sur la translocation systémique des NP inhalées, nous avons réalisé une revue de littérature concernant les études expérimentales de toxicocinétique basées sur des expositions respiratoires reposant sur des NP qui pourraient être rencontrées dans des expositions professionnelles ou environnementales.

Une recherche sur PubMed a donc été effectuée en décembre 2013 en utilisant les mots clefs suivants : « tissue distribution, biokinetics, toxicokinetics, translocation, nanoparticles, ultrafine particles, nanosized particles ». Des 1098 résultats, 246 ont été sélectionnés sur leur titre en excluant les études in vitro et les études de pharmacocinétiques portant sur des nanomédicaments. Après analyse des abstracts permettant l'exclusion des autres voies (orale, intraveineuse, intra péritonéale et dermique), 41 publications ont été analysées.

L'interprétation globale des résultats de ces études est rendue difficile par la disparité des protocoles. En effets ces études peuvent différer par :

- le mode d'exposition : chambre d'inhalation, inhalation nose-only, instillation intra trachéale, aspiration pharyngée,
- le type d'expositions : uniques ou répétées,
- la méthode de quantification,
- les doses administrées qui peuvent différer de 2 à 3 ordres de grandeurs avec parfois des niveaux de doses pouvant induire une réponse toxique ou des effets physiologiques tels qu'une inflammation pouvant modifier la toxicocinétique des NP (Hussain et al. 2013; Kreyling et al. 2013).

De plus, les tests de dissolution des NP nécessaires pour exclure les biais d'interprétation sont retrouvés dans seulement 1/3 des publications analysées. L'utilisation de méthodes d'imagerie pour confirmer la présence de NP dans les tissus périphériques permettrait également d'éviter ces biais. Ces méthodes sont cependant rarement utilisées et donnent parfois des résultats négatifs en raison de limites de détection élevées (Furuyama et al. 2009). Les principales caractéristiques des protocoles des études analysées sont résumées dans le Tableau 1.

	N	%	Référence
Modèle			
Humain	4	9	(Mills et al. 2006; Nemmar et al. 2002; van Ravenzwaay et al. 2009; Wiebert et al. 2006)
Souris	13	30	(Abid et al. 2013; Deng et al. 2007; Furuyama et al. 2009; Hussain et al. 2013; Kwon et al. 2008; Liu et al. 2009; Mohammad et al. 2013; Naota et al. 2009; Sadauskas et al. 2009; Shimada et al. 2006; Wang, Chen, et al. 2008; Wang, Liu, et al. 2008; Zhang et al. 2010)
Rat	26	61	(Carvalho, Peters, and Williams 2011; Choi et al. 2010; Elder et al. 2006; Eydner et al. 2012; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Geraets et al. 2012; He et al. 2010; Kao et al. 2012; Kreyling et al. 2002; Kreyling et al. 2009; Lipka et al. 2010; Oberdorster et al. 2004; Petitot et al. 2013; Sadauskas et al. 2009; Sarlo et al. 2009; Semmler et al. 2004; Semmler-Behnke et al. 2008; Shinohara et al. 2010; Sung et al. 2011; Takenaka et al. 2006; Takenaka et al. 2004; Takenaka et al. 2001; van Ravenzwaay et al. 2009; Yu et al. 2012; Zhang et al. 2010; Zhu et al. 2009; Al Faraj et al. 2009)
Composition			
Métal	28	65	(Abid et al. 2013; Choi et al. 2010; Elder et al. 2006; Eydner et al. 2012; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Furuyama et al. 2009; Geraets et al. 2012; He et al. 2010; Hussain et al. 2013; Kao et al. 2012; Kreyling et al. 2002; Kreyling et al. 2009; Kwon et al. 2008; Lipka et al. 2010; Liu et al. 2009; Petitot et al. 2013; Sadauskas et al. 2009; Schleh et al. 2013; Semmler et al. 2004; Semmler-Behnke et al. 2008; Sung et al. 2011; Takenaka et al. 2006; Takenaka et al. 2001; van Ravenzwaay et al. 2009; Wang, Liu, et al. 2008; Yu et al. 2012; Zhang et al. 2010; Zhu et al. 2009)
Carbone	11	25	(Deng et al. 2007; Kreyling et al. 2009; Mills et al. 2006; Naota et al. 2009; Nemmar et al. 2002; Oberdorster et al. 2004; Sadauskas et al. 2009; Shimada et al. 2006; Shinohara et al. 2010; van Ravenzwaay et al. 2009; Wiebert et al. 2006; Al Faraj et al. 2009)
Polymère organique	4	10	(Choi et al. 2010; Furuyama et al. 2009; Mohammad et al. 2013; Sarlo et al. 2009)

	N	%	Référence
Voie d'exposition			
Inhalation	23	51	(Carvalho, Peters, and Williams 2011; Elder et al. 2006; Eydner et al. 2012; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Geraets et al. 2012; Kao et al. 2012; Kreyling et al. 2002; Kreyling et al. 2009; Kwon et al. 2008; Mills et al. 2006; Nemmar et al. 2002; Oberdorster et al. 2004; Petitot et al. 2013; Sadauskas et al. 2009; Semmler et al. 2004; Shinohara et al. 2010; Sung et al. 2011; Takenaka et al. 2006; Takenaka et al. 2004; Takenaka et al. 2001; van Ravenzwaay et al. 2009; Wang, Chen, et al. 2008; Wiebert et al. 2006; Yu et al. 2012; Zhang et al. 2010)
Instillation intra trachéale	16	35	(Abid et al. 2013; Carvalho, Peters, and Williams 2011; Choi et al. 2010; Deng et al. 2007; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Furuyama et al. 2009; He et al. 2010; Kreyling et al. 2002; Lipka et al. 2010; Naota et al. 2009; Sadauskas et al. 2009; Semmler-Behnke et al. 2008; Shimada et al. 2006; Shinohara et al. 2010; Sung et al. 2011; Takenaka et al. 2001; Zhang et al. 2010; Zhu et al. 2009; Elder et al. 2006; Liu et al. 2009; Wang, Chen, et al. 2008; Al Faraj et al. 2009)
Instillation nasale	3	7	(Elder et al. 2006; Liu et al. 2009; Wang, Chen, et al. 2008)
Aspiration pharyngée	3	7	(Hussain et al. 2013; Mohammad et al. 2013; Sarlo et al. 2009)
Taille (nm)			
< 10	25	37	(Choi et al. 2010; Deng et al. 2007; Geraets et al. 2012; He et al. 2010; Kreyling et al. 2002; Kreyling et al. 2009; Lipka et al. 2010; Mills et al. 2006; Naota et al. 2009; Nemmar et al. 2002; Sadauskas et al. 2009; Semmler-Behnke et al. 2008; Shinohara et al. 2010; Sung et al. 2011; Takenaka et al. 2006; Takenaka et al. 2001; Zhang et al. 2010; Al Faraj et al. 2009)
[10; 50]	25	37	(Carvalho, Peters, and Williams 2011; Choi et al. 2010; Elder et al. 2006; Eydner et al. 2012; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Furuyama et al. 2009; Geraets et al. 2012; Hussain et al. 2013; Kao et al. 2012; Kwon et al. 2008; Liu et al. 2009; Mohammad et al. 2013; Oberdorster et al. 2004; Oberdorster et al. 2002; Petitot et al. 2013; Sadauskas et al. 2009; Sarlo et al. 2009; Schleh et al. 2013; Semmler et al. 2004; Semmler-Behnke et al. 2008; Shimada et al. 2006; Takenaka et al. 2004; Takenaka et al. 2001; van Ravenzwaay et al. 2009; Yu et al. 2012; Zhang et al. 2010; Mills et al. 2006)
[50;100]	7	10	(Abid et al. 2013; Choi et al. 2010; Mohammad et al. 2013; Sadauskas et al. 2009; Sarlo et al. 2009; Wang, Liu, et al. 2008; Wiebert et al. 2006)
[100;150]	2	3	(Choi et al. 2010; Wang, Chen, et al. 2008)
>150	9	13	(Carvalho, Peters, and Williams 2011; Choi et al. 2010; Eydner et al. 2012; Ferin, Oberdorster, and Penney 1992; Furuyama et al. 2009; Geraets et al. 2012; Liu et al. 2009; Mohammad et al. 2013; Sarlo et al. 2009; van Ravenzwaay et al. 2009; Zhang et al. 2010)

Tableau 1: Synthèse des caractéristiques des protocoles des 41 publications analysées

La synthèse des résultats des 41 publications analysées est représentée dans le Tableau 2 et la Figure 2.

Bien qu'un biais de publication soit probable (tous les organes ne sont pas forcément analysés dans les études), une translocation des NP était plus fréquemment retrouvée et à des niveaux plus élevés dans les organes riches en cellules réticulo-endothéliales tels que le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Probablement en raison de son rôle de filtre, des NP étaient également fréquemment retrouvées dans le rein bien qu'une excrétion urinaire soit rarement rapportée. Lorsqu'une translocation était démontrée dans d'autres organes tels que le cerveau, le cœur et les organes reproductifs, le niveau de rétention était d'un ou deux ordres de grandeurs inférieurs à celui des organes précédents.

Peu d'études ne retrouvent aucune translocation, ces résultats négatifs pouvant souvent être expliqués par le design des études et notamment les caractéristiques physicochimiques des aérosols utilisés (van Ravenzwaay et al. 2009).

Seules quelques études basées sur des techniques scintigraphiques d'inhalation de Technegas permettent d'avoir des résultats chez l'Homme. Dans ces études, certains auteurs rapportent une translocation systémique avec une accumulation au niveau du foie ou des voies excrétrices urinaires (Nemmar et al. 2002). En revanche, d'autres auteurs relativisent cette translocation de NP et attribuent toute ou partie de la fixation retrouvée au niveau de ces organes à la concentration de pertechnétate solubilisé (Brown, Zeman, and Bennett 2002).

Dans une revue de la littérature, Geiser et al. conclut qu'il y a suffisamment de preuve pour affirmer qu'une translocation à travers la barrière alvéolo-capillaire avec une distribution systémique est possible pour de nombreuses particules telles que les NP d'or, d'argent, de TiO₂, de polystyrène et de carbone de taille comprise entre 5 et 100 nm (Geiser and Kreyling 2010). Plus récemment, Nakane a proposé des seuils plus élevés de 10 µm pour une translocation interstitielle dans le poumon, de 1 µm pour la translocation dans la circulation sanguine et de 50 nm pour la translocation dans le cerveau et les autres organes périphériques (Nakane 2012).

Les taux de translocation rapportés dans la littérature sont variables en fonction des études : inférieur à 5% de la dose inhalée pour les NP d'iridium (Geiser and Kreyling 2010) et inférieur à 20% des NP de polystyrène de 20 nm (Sarlo et al. 2009). Lorsqu'une translocation systémique est rapportée, les taux de translocation sont très taille-dépendants (dix fois plus

important pour des NP d'iridium de 20 nm comparées à des particules de 80 nm ou 40 fois plus important pour des NP d'or de 1,4 nm comparées à des NP de 18 nm) sans toutefois qu'un seuil soit clairement retenu. Ce taux dépend également dans une moindre mesure de la composition chimique et du degré d'agglomération des particules (Geiser and Kreyling 2010). Schmid *et al.* ont estimé, compte tenu des taux de translocation rapportés dans la littérature, que sur une vie entière on pouvait estimer à 10^{11} le nombre total de particules ultrafine de la pollution atmosphérique qui pouvaient s'accumuler dans les organes périphériques soit 10000 fois moins que la dose inhalée totale (Schmid et al. 2009).

Chapitre 1 : revue de la littérature et mise au point de méthode

	Taille (nm)	Modèle	Voie	NP	Sang	Foie	Rate	Poumon	Cerveau	Cœur	Rein	Publication
< 10 nm	0.7	Souris	I.T.	carb.	●	?	?	?	?	?	?	Naota (2009)
	1	Rat	I.T.	CNT	?	?	?	●	?	?	?	Al Faraj (2009)
	1	Rat	I.T.	carb.	?	–	?	●	–	?	?	Shinohara (2010)
	1	Rat	Inh.	carb.	?	–	?	●	–	?	?	Shinohara (2010)
	1.4	Rat	I.T.	mét.	●	●	●	●	–	●	●	Semmler-Behnke (2008)
	2	Souris	I.T.	mét.	?	●	?	?	?	?	?	Sadauskas (2009)
	2.5	Rat	Inh.	mét.	–	●	?	●	●	?	●	Sung (2011)
	4	Rat	Inh.	carb.	●	●	●	●	●	●	●	Kreyling (2009)
	4	Rat	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Kreyling (2009)
	5	Rat	I.T.	mét.	●	●	●	●	–	?	●	Lipka (2010)
	5	Rat	I.T.	Q.D.	●	●	–	●	?	–	●	Choi (2010)
	5	Rat	I.T.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Choi (2010)
	5	Rat	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Kreyling (2002)
	5	Rat	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Kreyling (2002)
	6	Rat	Inh.	mét.	●	?	?	●	?	?	?	Takenaka (2006)
	6	Souris	I.T.	min.	●	●	●	●	–	●	●	Zhang (2010)
	6.6	Rat	I.T.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	He (2010)
	7	Rat	I.T.	mét.	?	●	?	?	?	?	?	Takenaka (2001)
	7	Rat	I.T.	O.P.	●	●	●	●	?	●	●	Choi (2010)
	9	Rat	I.T.	Q.D.	●	●	–	●	?	–	●	Choi (2010)
9	Rat	I.T.	O.P.	●	●	●	●	?	●	●	Choi (2010)	
[10 nm ; 50nm]	10	Homme	Inh.	carb.	–	–	–	–	–	–	–	Mills (2006)
	10	Homme	Inh.	carb.	●	●	?	●	?	?	?	Nemmar (2002)
	10	Souris	I.T.	carb.	–	–	–	●	–	–	?	Deng (2007)
	10	Rat	Inh.	mét.	–	●	●	●	●	?	●	Geraets (2012)
	10	Rat	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Kreyling (2009)
	12	Rat	I.T.	mét.	?	?	?	●	?	?	?	Ferin (1992)
	15	Rat	Inh.	mét.	?	?	?	?	●	?	?	Kao (2012)
	15	Rat	Inh.	mét.	●	●	?	●	●	●	●	Takenaka (2001)
	16	Rat	I.T.	Q.D.	–	–	–	●	?	?	–	Choi (2010)
	16	Rat	I.T.	Q.D.	●	●	–	●	?	–	●	Choi (2010)
	18	Rat	I.T.	mét.	–	●	●	●	–	–	–	Semmler-Behnke (2008)
	20	Souris	Inh.	mét.	●	?	?	?	?	?	?	Schleh (2012)
	20	Souris	I.T.	carb.	●	–	–	?	?	?	?	Shimada (2006)
	20	Rat	Inh.	mét.	?	●	●	●	●	?	●	Semmler (2004)
	20	Souris	I.T.	O.P.	●	?	?	●	?	●	●	Furuyama (2009)
	20	Souris	I.T.	mét.	–	●	●	●	–	●	●	Furuyama (2009)
	20	Rat	A.P.	O.P.	●	●	●	●	●	●	●	Sarlo (2009)
	20	Rat	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Yu (2007)
	21	Rat	I.T.	mét.	?	?	?	●	?	?	?	Ferin (1992)
	21	Rat	Inh.	mét.	?	?	?	●	?	?	?	Ferin (1992)
	21	rat	Inh.	mét.	●	?	?	●	?	?	?	Eydner (2012)
	21	rat	I.T.	O.P.	●	●	●	●	?	●	●	Choi (2010)
22	rat	I.T.	mét.	●	●	●	●	●	?	●	Zhu (2009)	

[10 nm ; 50nm]	23	rat	I.T.	Q.D.	-	-	-	●	?	?	-	Choi (2010)	
	23.5	souris	I.N.	mét.	●	●	-	●	●	-	●	Liu (2009)	
	25	rat	Inh.	mét.	?	-	-	●	-	?	-	van Ravenzwaay (2009)	
	25	rat	Inh.	carb.	?	●	?	●	-	-	-	Oberdörster (2002)	
	30	rat	I.N.	mét.	?	?	?	?	●	?	?	Elder (2007)	
	30	rat	Inh.	mét.	?	●	?	●	●	?	?	Elder (2006)	
	33	homme	Inh.	carb.	?	-	?	●	?	?	?	Brown (2002)	
	35	rat	Inh.	carb.	?	?	?	?	●	?	?	Oberdörster (2004)	
	35	rat	I.T.	O.P.	-	-	-	●	?	-	-	Choi (2010)	
	38	rat	Inh.	mét.	●	?	?	●	●	?	●	Petitot (2013)	
	40	rat	Inh.	mét.	-	●	●	●	●	?	●	Geraets (2012)	
	40	souris	A.P.	mét.	?	●	●	●	●	●	●	Hussain (2013)	
	[50 nm; 100 nm]	40	souris	I.T.	mét.	?	-	?	?	?	?	?	Sadauskas (2009)
40		rat	Inh.	mét.	-	●	?	●	?	?	-	Takenaka (2004)	
41		rat	Inh.	mét.	●	●	?	●	?	?	●		
50		souris	Inh.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Kwon (2008)	
50		Souris	A.P.	O.P.	●	●	●	●	●	●	●	Mohammad (2012)	
51		Rat	I.T.	O.P.	-	-	-	●	?	-	-		
52		Rat	I.T.	Q.D.	-	-	-	●	?	?	-	Choi (2010)	
80		Souris	I.N.	mét.	?	?	?	?	●	?	?	Wang (2008)	
90		Souris	I.T.	mét.	●	●	●	●	●	●	●	Abid (2013)	
97		Rat	I.T.	O.P.	-	-	-	●	?	-	-	Choi (2010)	
>100 nm		100	Souris	I.T.	mét.	?	-	?	?	?	?	?	Sadauskas (2009)
		100	Homme	Inh.	carb.	-	-	-	●	?	?	-	Wiebert (2006)
		100	Souris	A.P.	O.P.	●	●	●	●	●	●	●	Mohammad (2012)
	100	Rat	A.P.	O.P.	●	●	●	●	●	●	●	Sarlo (2009)	
	110	Rat	I.T.	Q.D.	-	-	-	●	?	?	-		
	130	Rat	I.T.	Q.D.	-	-	-	●	?	?	-	Choi (2010)	
	150	Souris	I.N.	mét.	?	?	?	?	●	?	?	Wang (2008)	
	200	Souris	I.T.	O.P.	?	?	?	●	?	●	-		
	200	Souris	I.T.	mét.	-	●	●	●	-	-	●	Furuyama (2009)	
	220	Rat	I.T.	O.P.	-	-	-	●	?	-	-	Choi (2010)	
	230	Rat	I.T.	mét.	?	?	?	●	?	?	?		
	250	Rat	I.T.	mét.	?	?	?	●	?	?	?	Ferin (1992)	
	250	Rat	Inh.	mét.	?	?	?	●	?	?	?		
250	Souris	A.P.	O.P.	●	-	●	●	-	●	●	Mohammad (2012)		
300	Rat	Inh.	mét.	?	?	?	●	?	?	?	Eydner (2012)		
315	Rat	Inh.	min.	?	-	-	●	-	?	-	van Ravenzwaay (2009)		
320	Rat	I.T.	Q.D.	-	-	-	●	?	?	-	Choi (2010)		

Tableau 2: Synthèse des résultats des 41 publications analysées. ● : résultats positifs, - : résultats négatifs, “?” : organes non analysés (abréviations: I.T.: Instillation intratrachéale, Inh.: inhalation, A.P.: aspiration pharyngée, I.N.: instillation nasale, CNT: nanotube de carbone, carb. : carbone, mét. : métallique, min. : minérale, O.P.: polymère organique, Q.D.: quantum dots)

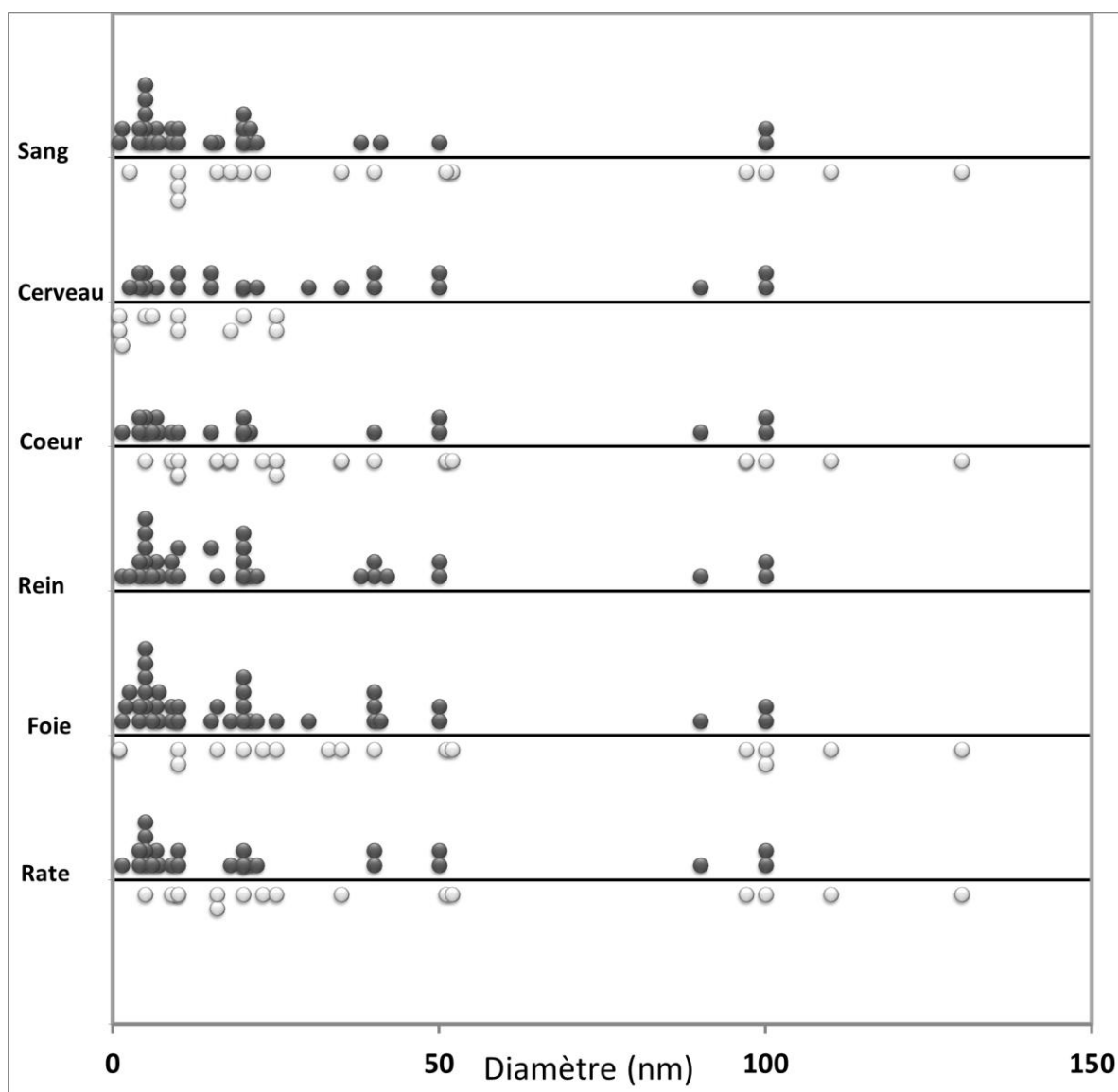


Figure 2: Synthèse des résultats des 41 publications analysées. Chaque point noir représente un résultat positif, chaque points gris représente un résultat négatif (absence de particule détectée).

1.2.3. Excrétion

Certains auteurs évoquent une absence d'excrétion urinaire ou fécale avec un risque d'accumulation à long terme pour des NP telles que les quantum dots (plus de 133 jours) ou des NP de dioxyde de titane (plus de 182 jours) (Landsiedel et al. 2012). Cette accumulation

synonyme d'un plus grand risque toxique est probablement plus importante pour des expositions répétées ou une exposition chronique continue (Hagens et al. 2007).

1.3.4.2 Excrétion urinaire

Les études basées sur des expositions intraveineuses de rongeurs ont montré qu'une filtration glomérulaire avec une excrétion urinaire des NP de diamètre hydrodynamique inférieur à 6 nm était possible ((Boyes et al. 2012; Choi et al. 2007; Li and Huang 2008; Riviere 2009). Ce seuil n'est a priori pas valable pour les particules fibreuses. En effet une excrétion urinaire de nanotube de carbone (NTC) de longueur supérieure à 2,5 µm et de diamètre de 20 nm a été rapportée (Singh et al. 2006).

L'excrétion urinaire peut être rapide avec une fixation au niveau du rein et de la vessie détectée dès 60 secondes après l'injection intra-veineuse et une élimination complète en 6 h (Landsiedel et al. 2012).

Une excrétion urinaire a également été rapportée avec d'autres modes d'expositions tels que des expositions respiratoires à des NP de carbone de 100 nm (Wiebert et al. 2006) ou des NP d'oxyde de fer de 26 nm de diamètre (Zhu et al. 2009) ou des expositions orales à des NP d'oxyde de zinc de 25 ou 80 nm (Lee et al. 2012). Cependant dans ces études, il était impossible d'exclure des biais d'interprétation liés à une excrétion urinaire de formes dissoutes.

1.3.4.2 Excrétion fécale

Les NP inhalées peuvent être excrétées dans les voies digestives par deux mécanismes :

- prise en charge des NP par la clairance muco-ciliaire du poumon et déglutition au niveau du larynx,
- capture par le foie des NP de la circulation sanguine et excrétion hépatobiliaire (Oberdorster, Elder, and Rinderknecht 2009). Ainsi une excrétion biliaire de 4% de la dose injectée dans les 24 premières heures a pu être démontrée (Hagens et al. 2007).

Une synthèse des données issues de ces études de toxicocinétique des NP est présentée dans la Figure 3.

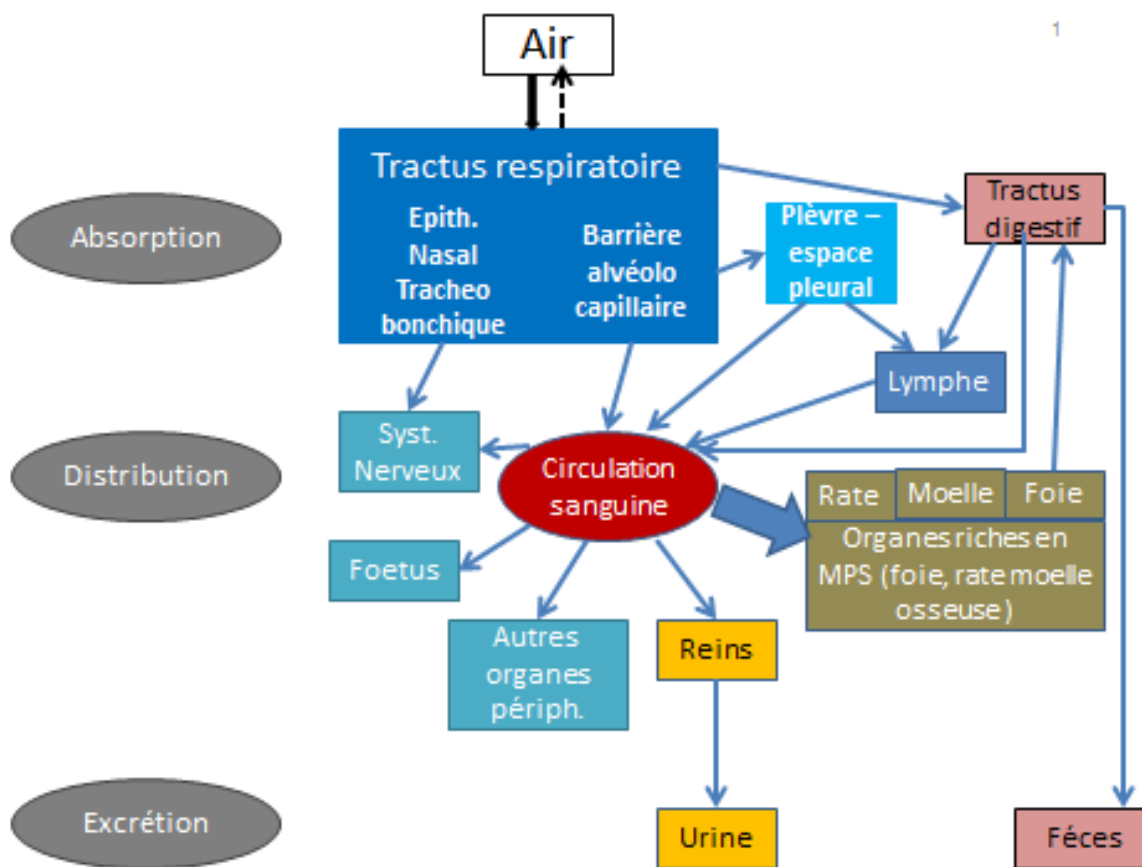


Figure 3 : Schémas récapitulatif des données issues des études de toxicocinétique des nanoparticules

1.3. Perspectives dans la biométrie des expositions aux NP

1.3.1. Quels sont les besoins ?

L'augmentation exponentielle de la production et de la commercialisation des produits issus des nanotechnologies implique une augmentation du risque d'exposition professionnelle ou environnementale qui peuvent être respiratoires, orales ou cutanées. Une des sources majeures d'exposition chez l'homme est le développement des nanotechnologies à visée médicale impliquant de nombreux types de NP tels que les NP d'oxyde de fer super paramagnétiques, les dendrimers, les NP de silice mésoporeuses, les NP d'or ou les NTC (Kunzmann et al. 2011).

Les activités professionnelles peuvent également être à l'origine d'exposition à des particules ultrafines non intentionnellement produites. Ainsi les activités de soudure peuvent être à

l'origine d'expositions à des NP métalliques comme des NP de manganèse, à des niveaux de concentration pouvant induire une réponse inflammatoire dans des études expérimentales d'inhalation chez les rongeurs (Elder et al. 2006). Ces expositions peuvent être à l'origine de la publication de case-reports dans lesquels les cliniciens ont essayé de caractériser les NP dans les tissus de leur patient. La présence de NP dans les tissus de patients a donc été rapportée dans le cadre de diverses pathologies mais dans la majorité des cas, il était impossible de conclure à un lien causal.

Un patient est décédé d'un syndrome de détresse respiratoire aigüe après une exposition à des NP de nickel dans des activités de vaporisation de nickel par arc électrique. Des taux élevés de nickel ont été retrouvés dans des biopsies rénales et dans son urine et des NP de nickel de taille inférieure à 25 nm ont été détectées dans ses macrophages alvéolaires (Phillips et al. 2010; Rendall, Phillips, and Renton 1994).

Chez deux patients décédés d'une pneumoconiose après des activités de soudure d'aluminium, une analyse en microscopie électronique à balayage a montré des concentrations en NP d'aluminium de 8,5 à 11,2 milliards de particules/cm³. Des analyses complémentaires par microscopie électronique à transmission ont montré que les particules étaient principalement des agrégats de NP de taille individuelle plus petite que 10 nm (Hull and Abraham 2002).

Sept jeunes chinoises ont présenté un tableau respiratoire associant dyspnée, épanchement pleural et fibrose pulmonaire progressive après une exposition professionnelle de plusieurs mois à des activités de peinture par pulvérisation avec une suspicion d'exposition à des NP d'ester de polyacrylate de 30 nm de diamètre. Dans une première publication de ces cas, des NP ont été retrouvées en MET dans le liquide pleural, les cellules épithéliales bronchiques et mésothéliales faisant évoquer aux auteurs une translocation pulmonaire régionale (Song, Li, and Du 2009). Compte tenu d'une évaluation en milieu de travail jugée insuffisante et d'un manque d'informations sur la composition chimique des particules retrouvées, la publication de ce cas a fait l'objet d'une réponse émanant d'un consortium de toxicologues spécialisés dans les NP remettant en cause les conclusions des auteurs et notamment le lien causal entre les symptômes et les NP retrouvées dans les échantillons biologiques (Donaldson et al. 2009). Des analyses complémentaires en MET ont permis de confirmer la présence de NP de silice

dans les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales et le liquide pleural des patientes (Song et al. 2011).

La présence de NP carbonées au niveau du mésothélium péritonéal d'une patiente, confirmée en MET a été attribuée à une exposition respiratoire à des poussières de toner suggérant une possible translocation systémique (Theegarten et al. 2010).

Une translocation systémique de particules de carbone était déjà anciennement évoquée dans la littérature chez des mineurs de charbons chez lesquels des pigments noirs étaient retrouvés dans le foie ou la rate, bien que la nature particulière de ces pigments n'ait pas été démontrée en microscopie électronique (LeFevre et al. 1982).

Des pathologies pulmonaires ont également été attribuées à des expositions environnementales à des NP. Ainsi, sept patients suivis dans le programme de surveillance médicale des professionnels exposés dans le cadre des attentats du World Trade Center de l'hôpital Mount Sinai ont été explorés par thoracoscopie et biopsie pulmonaire en raison de symptômes respiratoires persistants. Des nanotubes de carbone de différentes tailles ont été trouvés dans le poumon de 4 patients à des concentrations allant de 10040 à 230000/g de poumon humide. Ces NTC étaient similaires à ceux retrouvés dans des prélèvements atmosphériques sur le site du World Trade center (Wu et al. 2010).

1.3.2. Quels sont les outils disponibles ?

Pour être utilisables dans un contexte clinique, les outils précédemment présentés doivent répondre à plusieurs critères :

- être suffisamment sensibles avec une limite de détection et une résolution adaptées à l'échelle des NP,
- être disponibles et pouvoir être facilement mis en œuvre,
- reposer sur des méthodes de préparation et des protocoles analytiques reproductibles.

Dans les premiers case-report décrits dans le chapitre précédent, la première étape de la démarche diagnostic adoptée par les auteurs était généralement de confirmer la présence des NP dans les échantillons pulmonaires (parenchyme, LBA, liquide pleural) (Phillips et al. 2010; Song, Li, and Du 2009; Theegarten et al. 2010).

Compte tenu de sa relative disponibilité, de son utilisation croissante par les anatomopathologistes et de la possibilité de caractériser aussi bien la structure que la composition chimique des NP, la microscopie électronique a été utilisée dans toutes ces publications et semble inévitable dans ce cadre.

Cependant, comme expliqué précédemment, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole d'analyse en microscopie électronique permettant d'obtenir des résultats quantitatifs pour les NP comme c'est le cas pour les particules d'amiante ou d'autres particules minérales non fibreuses. Afin de conclure ou pas à un excès de NP dans un tissu, il faut obtenir des données quantitatives et les comparer à des niveaux de référence. Pour cela, il est à l'heure actuelle nécessaire de recourir à des méthodes quantitatives déjà utilisées en milieu hospitalier par les laboratoires de pharmacologie ou de toxicologie. Par exemple, pour les NP métalliques, la spectrométrie d'émission optique par torche à plasma ou la spectrométrie de masse par torche à plasma peuvent être utilisées. Cela nécessite en revanche de pouvoir différencier le métal sous forme particulaire des métaux dissous ce qui est possible avec des méthodes telles que le fractionnement par couplage flux/force de sédimentation (Deering et al. 2008).

Une fois les particules identifiées et quantifiées, conclure à une rétention significative ou à un lien causal est parfois impossible pour le clinicien dans la mesure où il n'existe pas de valeur de référence pour interpréter les données. Il est donc crucial de pouvoir acquérir ces données en utilisant des méthodes validées et reproductibles sur des échantillons de la population générale mais aussi dans différents groupes d'exposition.

1.3.3. Quels échantillons ?

Les résultats des études de toxicocinétique des NP présentées précédemment peuvent permettre de déterminer quels échantillons ou fluides biologiques pourraient être utilisés dans un but de biométrie des NP.

Ainsi les NP inhalées pourraient être recherchées dans le parenchyme pulmonaire, mais également le LBA ou le liquide pleural en cas d'épanchement (Geiser and Kreyling 2010) voire dans des expectorats provoqués. Une alternative non invasive qui doit encore être étudiée avant d'être utilisée en routine est le recueil et la recherche de particules dans les condensats d'air exhalé (Sauvain et al. 2014).

Sous réserve d'une cinétique compatible et de méthodes de préparation adaptées, les NP inhalées pourraient également être recherchées dans le sang, l'urine, et les fèces mais également dans des tissus tels que le foie ou la rate.

1.3.4. Quelles sont les premières données disponibles ?

1.3.4.1. *Extrapolation des études expérimentales à l'homme*

Plusieurs différences inter espèces doivent être prises en compte pour extrapoler à l'homme les résultats des études expérimentales basées principalement sur des modèles murins. Par exemple, il existe des différences anatomiques (division bronchique monopodale et absence de bronchiole respiratoire chez le rat) ou physiologiques (respiration nasale et clairance pulmonaire plus rapide chez le rat) (Brown, Wilson, and Grant 2005; Kreyling, Semmler-Behnke, and Moller 2006; Kreyling et al. 2013). De plus, les études d'inhalation ou d'instillation ne simulent pas de façon satisfaisante les expositions de la vie réelle dans lesquelles les aérosols ont des propriétés physicochimiques complexes qui peuvent faire intervenir des mécanismes de déposition ou de clairance différents (Brown, Wilson, and Grant 2005). Enfin, les doses utilisées dans les études expérimentales peuvent être de 100 à 1000 fois supérieures à celles rencontrées dans la vie réelle (Geiser and Kreyling 2010).

Compte tenu de ces difficultés, les tentatives d'extrapolation donnent des résultats variables selon les auteurs. En utilisant les résultats des études d'inhalation à long terme chez le rat, Kreyling *et al* ont estimé une accumulation d'environ 0,01 à 0,05% de la dose administrée dans les organes périphériques ce qui correspond à entre 4 et 20% de la dose quotidienne déposée dans le poumon. Exprimé en nombre de particules, cela correspond à environ 3×10^9 particules ultrafines déposées par jour dans le poumon (3×10^{11} en un an) et de 1 à 6×10^8 particules ultrafines qui se seraient déposées dans chaque organe périphérique ce qui représente une masse de moins de 10 ng (Kreyling, Semmler-Behnke, and Moller 2006).

D'autres auteurs estiment qu'environ 5×10^{12} particules ultrafines provenant de l'atmosphère sont déposées tous les jours dans le poumon humain et 8×10^{11} seraient absorbées oralement (Kendall, 2012), alors que Schmid *et al.* estiment à 10^{11} le nombre total de particules ultrafine de la pollution atmosphérique transférées aux organes périphériques (Schmid et al. 2009).

1.3.4.2. *Premiers résultats de biométrie des particules fines et ultrafines dans les tissus humains*

L'évaluation du risque toxicologique lié aux NP nécessite de développer des méthodes pour les quantifier dans l'environnement et dans les échantillons biologiques humains (Kendall, 2012). A ce jour les données humaines sont peu nombreuses.

Comme vu précédemment, la rétention pulmonaire en particules résulte d'un équilibre entre la déposition et les mécanismes de clairance (Oberdorster et al. 2004). Compte tenu d'une cinétique de clairance très lente chez l'homme et diminuant avec le temps de rétention, Geiser *et al* ont estimé qu'environ 10 à 20 % des NP insolubles ne seraient jamais épurées dans les conditions physiologiques et probablement plus dans les fortes expositions telles que les expositions au tabac ou les expositions professionnelles (Geiser and Kreyling 2010).

A ce jour, les données sur la rétention pulmonaire des particules fines et ultrafines sont habituellement limitées aux plus grosses particules minérales, fibreuses ou non fibreuses, impliquées dans les pneumoconioses ou les cancers pulmonaires tels que l'amiante, la silice et les particules de béryllium. Bien que les publications suivantes ne soient pas strictement limitées aux NP, elles apportent les premières informations sur la composition des NP retrouvées dans le poumon humain.

La déposition pulmonaire de particules ultrafines issues de la pollution a été démontrée en microscopie électronique par la présence de particules carbonées dans les macrophages du liquide bronchio-alvéolaire d'adulte (Hauser et al. 2001). De plus, la concentration en agrégats carbonés dans les macrophages alvéolaires recueillis dans les crachats induits chez des enfants ou dans le liquide broncho-alvéolaire, estimée en microscopie optique, peut être corrélée à des données d'exposition aux particules ultrafines de la pollution liée au trafic automobile (Bunn et al. 2001) ou à des sites industriels (Kalappanavar et al. 2012). Elle a été également corrélée à une diminution dose-dépendante des paramètres fonctionnels respiratoires (Kulkarni et al. 2006).

En utilisant la microscopie électronique à balayage pour analyser des sections de parenchyme pulmonaire provenant d'autopsies réalisées pendant l'épisode du smog de Londres en 1952, Hunt *et al* ont montré la présence de suies (agrégats de particules ultrafines de carbone) et de particules fines (<1 μm) métalliques (Hunt et al. 2003). Des analyses quantitatives n'ont pas

pu être réalisées en raison du faible volume d'échantillon analysé et en raison des difficultés à différencier les particules carbonées du carbone endogène des échantillons (Bunn et al. 2001). Churg *et al* ont publié plusieurs études sur le contenu du parenchyme pulmonaire provenant d'autopsies de patients non-fumeurs résidents dans une ville peu polluée (Vancouver) comparés à des résidents d'une ville très polluée (Mexico City). Les échantillons ont été traités par digestion alcaline associée à une combinaison de méthode d'ultracentrifugation et de filtration pour concentrer les particules analysées en MET. Dans cette étude, en dépit d'une très grande variabilité interindividuelle, ils ont retrouvé des différences dans la concentration en particules et leur composition chimique entre les deux groupes. La concentration moyenne en particules chez les résidents de Mexico City était significativement supérieure à celle des résidents de Vancouver (respectivement $2,05 \times 10^9$ et $0,28 \times 10^9$ particules/g de poids sec). Dans les échantillons provenant de Mexico City, 25 % des particules étaient des agrégats de PUF de carbone similaires aux particules émises par les procédés de combustion retrouvées dans les échantillons d'air de cette ville. Ces particules ont été rarement observées dans les échantillons pulmonaires de Vancouver. Un résultat inattendu était la rareté des particules ultrafines contrastant avec les données expérimentales sur la déposition des NP. Les auteurs ont conclu que cette rareté était liée à une clairance rapide (Brauer et al. 2001; Bunn et al. 2001; Churg and Brauer 1997, 2000).

L'absence de méthode de référence pour la préparation des échantillons, le comptage et la classification des particules complique la comparaison des résultats de ces études et ceux des études à venir. Par exemple, en utilisant une technique similaire (digestion à l'hydroxyde de potassium, ultracentrifugation et analyse en MET), Wu *et al* ont trouvé une rétention en particules de deux à quatre ordres de grandeur inférieure pour les silicates (Wu et al. 2010). Bien que cette différence puisse être expliquée par une variabilité interindividuelle, elle peut aussi l'être par des différences dans les protocoles notamment dans les règles de comptage et de classification (en agrégats ou particules individuelles).

Il faut noter également que dans les publications présentées, les résultats sont habituellement exprimés en concentration numérique, alors que les études de toxicité suggèrent que les effets biologiques tels que l'inflammation, les effets histologiques, la écotoxicité et la cancérogénicité sont mieux corrélés avec la surface développée des particules (Kendall and Holgate 2012).

A ce jour, il n'est pas clairement établi que l'on puisse retrouver des NP inhalées ou ingérées par l'homme dans ces organes périphériques tels que cela l'a été démontré pour des particules de charbon (Wu et al. 2010) ou de silice et d'amiante. En effet, malgré leur longueur pouvant dépasser plusieurs microns, des fibres d'amiante ont été retrouvées dans des organes périphériques tels que le rein, le cœur, le foie, la rate (Auerbach et al. 1980) et même dans des tissus placentaires et fœtaux (poumon, foie, muscles) (Haque, Vrazel, and Uchida 1998).

Des particules de taille micronique ou nanométrique de diverses compositions chimiques (métalliques, matériaux céramiques) ont également été retrouvées en MEB dans le sang et différents tissus (le foie, le rein, la rate, et les tissus fœtaux). Cependant, les données lacunaires sur la caractérisation chimique et l'absence de quantification ne permettaient pas de conclure sur l'origine de ces particules ni sur le risque qu'elles représentaient (Gatti et al. 2011; Gatti et al. 2004).

Une synthèse des publications se rapportant à l'identification et à la quantification des NP dans les tissus et à leur translocation extra pulmonaire chez l'Homme est présentée dans le Tableau 3.

Date	Type	Particules	Taille	Matériel-méthodes	Principaux résultats	Réf.
2011	Série autopsique	Particules métalliques	–	Analyse en MEB de coupes de foie et de rein de 16 fœtus	Particules (dont certaines <100 nm) métalliques dans les 2 types d'échantillons	Gatti, 2011
2001	Série autopsique	Composition diverse	–	Analyse en MET d'échantillons pulmonaires traités par microfiltration et ultracentrifugation	Concentration en particule plus importante dans les échantillons de Mexico (25% d'agrégats de carbone)	Churg, 2000; Brauer, 2001
1997	Série autopsique	Composition diverse	–	Analyse en MEB de coupes de parenchymes pulmonaires provenant d'autopsies faites pendant le smog londonien de 1952	Présence d'agrégats de PUF de carbone et de particules fines métalliques dans les échantillons pulmonaires	Hunt, 2003
2010	Case report	NP de carbone	Ag. de 30 à 70 nm	Analyse en MET-MEB de black spots péritonéaux prélevés par laparoscopie	Présence de NP de carbone en sub mésothélial suggérant une translocation systémique	Theegarten, 2010
2009	Case report	Silice	2 à 20 nm	Analyse métrologique et analyse MET-MEB après 7 cas de pathologies pulmonaires après des activités de peinture par pulvérisation	NP de polyacrylate de 30 nm en milieu de travail. NP de silice de 20 nm dans les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales et le liquide pleural.	Song, 2010; Song, 2011
2009	Case report	Nanotubes de carbone (NTC)	Longueur variable	Analyse en MET de poumons de 7 patients décédés après exposition pendant les attentats du World Trade Center	Présence de NTC dans le poumon de 4 patients à des concentrations de 11,000 à 230,000/g.	Wu, 2010
2004	Case report	Particules métalliques	–	Analyse MEB de 16 échantillons de matériel biologique recueillis sur des filtres caves	Nombreux corps étrangers certains <100 nm métalliques (plomb, bismuth, tungstène)	Haque, 1998
2002	Case report	NP d'aluminium	Ag. de 340 nm de NP de 10 nm	Analyse MEB et MET d'échantillons de poumons de 2 patients décédés de pneumoconiose après des activités de soudure d'aluminium	Ag. de NP d'aluminium (Concentration de 8,5 à 11,2 milliard/cm ³)	Hull, 2002
1994	Case report	NP de nickel	Ag. et NP de 50 nm	Analyse métrologique et analyse MET-MEB de tissus après le décès d'un patient après des activités de traitement métallique par arc électrique	Présence de NP de nickel de 4 à 25 nm dans les macrophages alvéolaires, nickel urinaire > 10 fois la normale	Philips 2010; Rendall, 1994
2001	Case report	NP de carbone	–	Analyse MET de macrophages isolés du LBA de 14 sujets non fumeurs	Présence de PUF de carbone chez tous les sujets (exposition environnementale)	Hauser, 2001
2006	Etude exp.	Technegas : NP de carbone- ^{99m} Tc	Ag. de 108 nm de NP de 4 à 21 nm	Etude d'inhalation conduite sur 10 volontaires sains. Rétention estimée par scintigraphie	Pas de translocation dans le foie ou la rate. Fixation dans le sang et l'urine liée à des ions pertechnetate	Mills, 2006
2006	Etude exp.	Technegas : NP de carbone- ^{99m} Tc	Ag. de 98 nm	Etude d'inhalation sur 6 non fumeurs, 4 fumeurs et 5 asthmatiques. Rétention estimée par scintigraphie	Pas de preuve d'une translocation systémique	Wiebert, 2006
2002	Etude exp.	Technegas : NP de carbone- ^{99m} Tc	Ag. de 61nm de NP de 21 nm	Etude d'inhalation conduite sur 10 patients atteints de BPCO et 9 témoins. Rétention estimée par scintigraphie	Déposition plus importante chez les patients. Pas de translocation systémique	Song, 2010; Song, 2011
2002	Etude exp.	Technegas : NP de carbone- ^{99m} Tc	Ag. <100 nm de NP de 5 à 10 nm	Etude d'inhalation conduite sur 10 volontaires sains. Rétention estimée par scintigraphie	Translocation systémique rapide des PUF de carbone avec accumulation dans le foie	Nemmar, 2002

Tableau 3 : Synthèse des publications se rapportant à l'identification et à la quantification des NP dans les tissus et à leur translocation extra pulmonaire chez l'homme. (Ag. : agrégats, NTC : nanotube de carbone)

1.4. Conclusion

Dans cette revue de la littérature, sont synthétisées les premières données scientifiques permettant d'évaluer la faisabilité et l'intérêt de la biométrie des NP dans un but clinique.

L'analyse des premiers case-report liés aux NP montrent que les cliniciens ont dû faire face à des difficultés liées au manque de méthode standardisée pour analyser les tissus et fluides biologiques et au manque de valeurs de référence pour interpréter leurs résultats.

Les études de toxicocinétique ont démontré que les voies préférentielles d'entrée des NP présentes dans l'air sont l'appareil respiratoire et l'appareil digestif avec une possible translocation systémique et une accumulation dans les organes périphériques ou une excrétion dans les fèces ou l'urine.

Ces études fournissent des méthodes et des outils d'analyse qui peuvent potentiellement être utilisés dans le cadre du développement de la biométrie des NP à la fois dans l'évaluation rétrospective des expositions mais également dans le suivi en médecine du travail des populations exposées.

Des études sont nécessaires mettre au point des méthodes reproductibles pour caractériser et quantifier les NP dans des échantillons biologiques tels que le sang ou l'urine pour la surveillance de travailleurs exposés ou dans des échantillons obtenus de façon invasive (LBA, biopsies parenchymateuses, liquide pleural), lors de la prise en charge médicale de pathologies suspectées d'être en lien avec une exposition à ces particules.

Les données actuelles de la littérature indiquent que la biométrie des NP pourrait reposer sur des méthodes d'imagerie telle que la microscopie électronique indispensable pour confirmer la nature particulaire, la morphologie et la composition chimique des NP dans les tissus. En l'absence de méthode de quantification en microscopie électronique, cette analyse peut être associée à une analyse quantitative qui pourrait reposer sur des méthodes telles que les analyses élémentaires en ICP- AES ou ICP-MS.

2. Mise au point de la méthode d'analyse

2.1. Protocole initial

Afin de mettre au point notre méthode, nous avons utilisé comme point de départ la méthode utilisée par le laboratoire d'étude des particules inhalées de la ville de Paris (LEPI) pour les analyses minéralogiques de parenchyme pulmonaire ou de liquide de lavage broncho-alvéolaire (particules fibreuses et particules non fibreuses). Le protocole détaillé de cette méthode est disponible en annexe 1. Les principales caractéristiques de cette méthode et les tests réalisés pour l'adapter aux NP est présenté dans la Figure 4. Cette méthode est dérivée de la norme NF X 43-050 qui définit la méthode de référence pour la détermination de la concentration de l'air en fibres d'amiante par microscopie électronique à transmission (AFNOR 1996).

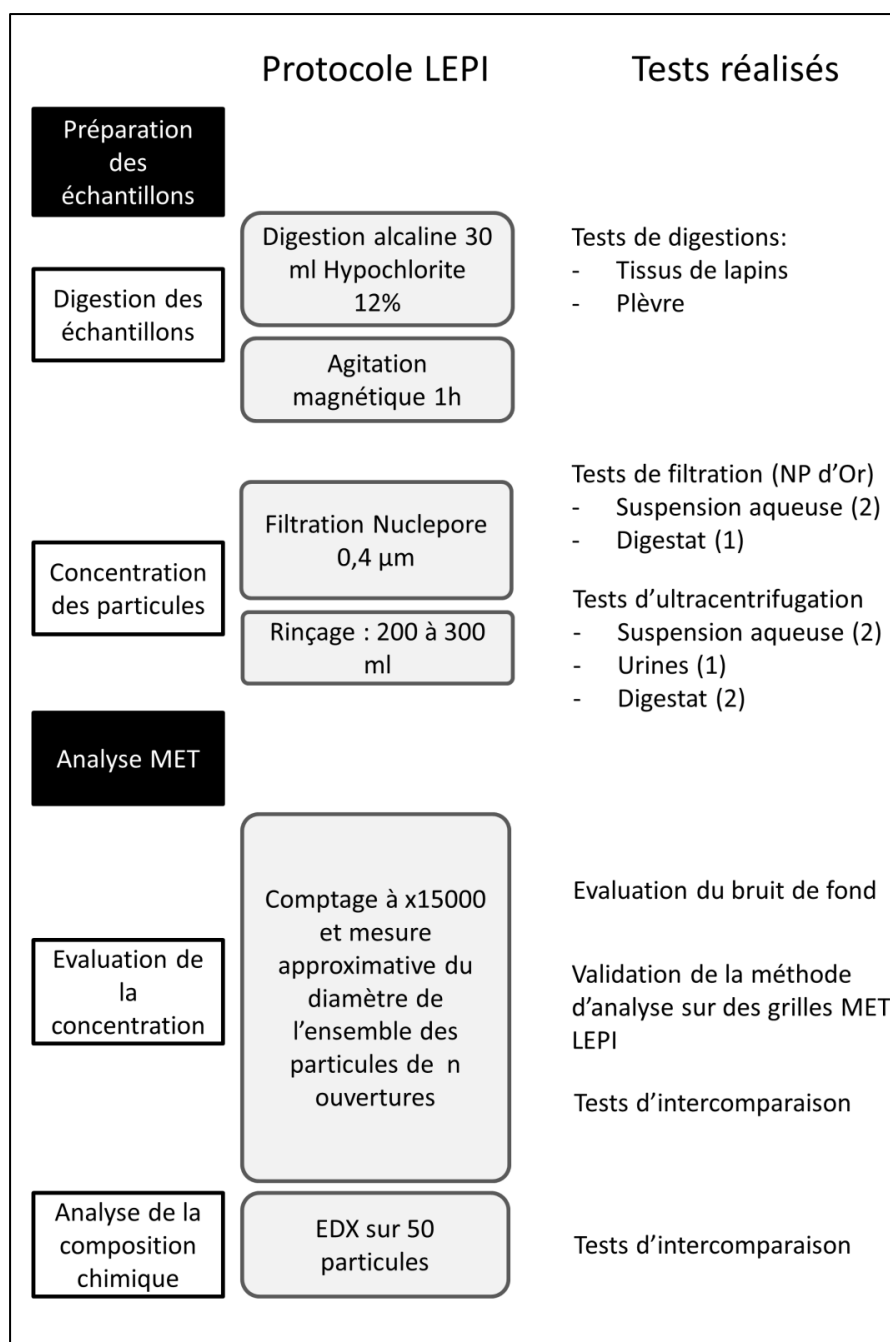


Figure 4 : Synthèse des caractéristiques de la méthode LEPI pour les analyses minéralogiques de tissus et fluides biologiques et synthèse des tests réalisés pour l'adapter aux NP.

En résumé, la méthode repose sur une préparation des échantillons par digestion-microfiltration selon les étapes suivantes :

- digestion alcaline de l'échantillon par de l'hypochlorite de sodium (eau de Javel à 12°) sous agitation magnétique à température ambiante durant 1h,
- microfiltration du digestat sur des filtres en polycarbonate de 0,4 µm de porosité sur lesquels une couche de carbone a été déposée en utilisant un évaporateur de carbone (filtres pré carbonés). La filtration se fait en plusieurs étapes (aliquots de 5 à 10 ml avec rinçage par de l'eau Ultrapure®)
- évaporation d'une deuxième couche de carbone piégeant les particules,
- transfert des particules piégées entre les 2 couches de carbone sur une grille de microscopie électronique en éliminant le filtre de polycarbonate avec du chloroforme. La méthode de transfert utilisée est celle du transfert doux par la méthode du laveur de Jaffe (Figure 5).

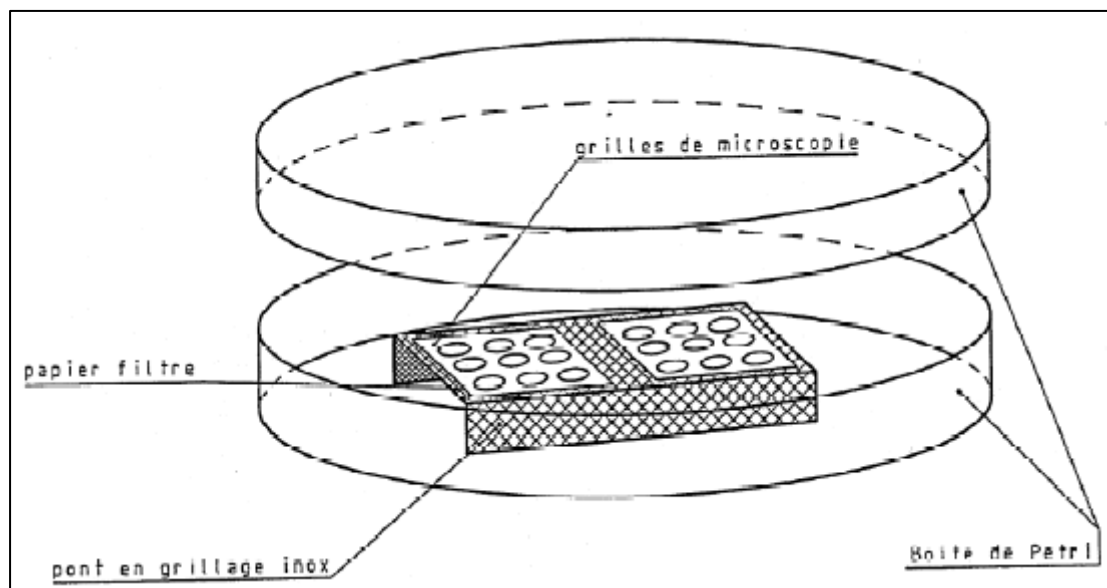


Figure 5 : Transfert des particules sur une grille de MET par la méthode du laveur de Jaffe (tiré de (INRS 2013))

2.2. Mise au point de la méthode de digestion

2.2.1. Revue de la littérature sur les méthodes de digestion existantes

Une revue de la littérature des différentes techniques de digestion utilisées dans les analyses de rétention des tissus ou de fluides biologiques humains en particules a été réalisée. Une synthèse de cette revue est présentée dans le tableau 4 page suivante.

En raison du risque moins élevé de modification des nanoparticules, la méthode de digestion alcaline à l'hypochlorite de sodium et microfiltration a été retenue.

Technique d'élimination de la matrice biologique		Technique de séparation des particules	Limites de la méthode	Références
Chimique	Hydroxyde de potassium	Centrifugation	Modification de l'état d'aggrégation des particules	(Wu et al. 2010)
	Hypochlorite de sodium	Microfiltration sur filtre en polycarbonate	Persistance de résidus de digestion	(Pairon, Martinon, and Brochard 1998; Roggli, Piantadosi, and Bell 1986; Schenker et al. 2009; Schneider, Sporn, and Roggli 2010)
	Hypochlorite de sodium	Microfiltration sur filtre en polycarbonate	Persistance de résidus de digestion	(Stettler, Sharpnack, and Krieg 2008)
	Hypochlorite de sodium	Centrifugation puis microfiltration sur filtre en polycarbonate	Modification de l'état d'aggrégation des particules	(Brauer et al. 2001)
Enzymatique	Collagénase, papaïne, DNase	Microfiltration sur filtre en polycarbonate	Complexité du protocole Nombre important de réactifs augmentant le risque de contamination	(Searl and Cullen 1997)
Physique	Lyophilisation au four à Plasma	Microfiltration sur filtre en polycarbonate	Génération de particules carbonées	(Bernstein et al. 2008)
Mixte	Homogénéisation mécanique Digestion enzymatique (collagénase, hyaluronidase, protéinase K)	Ultracentrifugation	Complexité du protocole Nombre important de réactifs augmentant le risque de contamination	(Deering et al. 2008)
	Digestion acide (acide sulfurique et nitrique) et microonde	Microfiltration sur filtre en polycarbonate	Risque de dissolution des particules métalliques	(Ishimatsu et al. 1999)

Tableau 4: Synthèse de la revue de la littérature des différentes techniques de préparation d'échantillons biologiques pour l'analyse de particules.

2.2.2. Tests de digestion

2.2.2.1. *Tests de digestion sur différents organes de lapin*

Plusieurs séries de tests de digestion portant sur des échantillons de différents organes de lapin (cerveau, rein, foie, myocarde, muscle, poumon) ont été réalisées pour déterminer les paramètres optimaux pour la digestion (volume et concentration de l'hypochlorite, volume de rinçage, temps et température de digestion). Les critères de jugement étaient :

- l'aspect macroscopique du digestat (limpidité, présence de résidu),
- le temps de filtration,
- l'aspect en microscopie électronique (persistance de résidu ou non).

Compte tenu des résultats de ces tests qui ne sont pas présentés en détail, le protocole initial a été modifié comme suit :

- réduction du volume d'hypochlorite utilisé (10 ml au lieu de 30 ml),
- réduction des volumes de rinçage, (de 200-300 ml à 100 ml),
- abandon de la digestion sous agitation magnétique remplacée par une agitation orbitale pour éviter le risque de perte de particules métalliques ferromagnétiques.

Les modifications apportées au protocole (protocole LEPI modifié) ont permis d'améliorer l'aspect des grilles en microscopie électronique et de diminuer les temps de filtration de 1h à moins de 20 min.

Le traitement des filtres après filtration selon le protocole utilisé par Stettler *et al* (traitement du filtre après filtration en filtrant successivement et à deux reprises 10ml d'isopropanol, 10ml d'acide oxalique molaire, 10 ml d'hypochlorite et 10 ml d'eau Ultrapure®) (Stettler, Sharpnack, and Krieg 2008) permet d'améliorer discrètement l'aspect du filtre en MET. Cette procédure a fait l'objet de tests décrits ci-après mais n'a pas été retenue en raison du volume de réactif nécessaire qui augmente le risque de contamination et le risque de perte par filtration.

L'homogénéisation mécanique par broyage avec ou sans congélation dans de l'azote liquide préalable à la digestion ne montre pas d'amélioration et n'a donc pas été retenue.

2.2.2.2. *Tests de digestion de plèvre*

La plèvre étant un tissu riche en graisse, la digestion par la méthode LEPI donne de mauvais résultats en termes de temps de filtration (colmatage des filtres) et d'aspect en MET.

Les principaux résultats des tests de digestion réalisés sur des échantillons de plèvres et de black spots (zone de plèvre anthracotique) provenant de l'étude sur la translocation pleurale présentée dans la partie n°2 de ce manuscrit sont synthétisés dans le Tableau 5 ci-après.

	Protocole de digestion	Tissus	Poids sec (mg)	Durée de filtration (min)	Aspect digestat	Aspect MET
Test 1	LEPI modifié	Plèvre	173.5	25	Trouble	médiocre + cristaux
Test 2	Broyage mécanique Digestion : hypochlorite à 40°C Rinçage + 5 ml Isopropanol à chaque rinçage	Plèvre	192.5	15	Limpide +résidu	médiocre
Test 3	Méthode Stettler	Plèvre	126.0	20	Limpide + résidu	médiocre
Test 4	Digestion : hypochlorite chauffée 40°C + 5 ml Isopropanol	Plèvre	155.9	10	Trouble et mousseux	correct
		Black spot	183.9	10	Limpide sans résidu	illisible
Test 5	Digestion hypochlorite Chauffage lors digestion Ajout 5 ml Isopropanol en fin de digestion	Plèvre	221.1	< 5	Limpide	correct
		Black spot	70.4	10	Limpide + résidu	chargé

Tableau 5: Synthèse des résultats des tests de digestion réalisés sur des échantillons de plèvre et de black spots.

Compte tenu de ces tests, le protocole qui a été retenu pour le traitement des échantillons de plèvre est le suivant:

- digestion alcaline à l'hypochlorite de sodium portée à 40°C en début de digestion,
- durée de digestion: 1 h,
- Adjonction de 5ml d'isopropanol en fin de digestion et agitation manuelle.

2.3. Tests de filtration

2.3.1. Justification - Objectif général

La porosité des membranes en polycarbonate habituellement utilisées dans les analyses de rétention tissulaire en particule est de 400 nm.

Les particules de diamètre inférieur à ces pores et donc les particules individuelles nanométriques sont susceptibles d'être perdues lors de la filtration entraînant un biais de sous-estimation.

Des tests préliminaires de filtration ont été réalisés avec des filtres de porosités de 50 et 100 nm. Ces tests ont été non concluants en raison du colmatage rapide du filtre ou de temps de filtration trop longs. Les tests ont donc été réalisés en utilisant des filtres de porosité de 200 et 400 nm.

2.3.2. Test n°1 : Evaluation des pertes en fonction de la porosité des filtres

2.3.2.1. Objectifs :

Comparer les taux de perte en particules individuelles lors de la microfiltration avec des membranes de porosité de 200 et 400 nm.

2.3.2.2. Protocole

Préparation des suspensions de NP : les tests de filtration ont reposé sur des suspensions de NP d'or commerciales (Gold Colloids, BBI, Royaume Uni) en raison des propriétés électrostatiques de ces particules qui restent à l'état individuel dans une suspension aqueuse. Compte tenu des tests préliminaires de comptage sur des grilles de poumons de soudeurs présentés ci-après, 2 tailles ont été testées: 20 nm et 60 nm de diamètre.

Des microgouttes de 5 µl de ces suspensions ont été déposées sur des grilles de microscopie électronique pré carbonées, séchées à température ambiante puis analysées en MET afin de déduire les concentrations numériques. Les résultats suivants ont été trouvés :

- NP de 20 nm de diamètre : $1,04 \times 10^{11}$ particules/ml (56,6 µg/ml d'or),
- NP de 60 nm de diamètre : $2,4 \times 10^{10}$ particules/ml (56,8 µg/ml d'or).

Une suspension mère est préparée en mélangeant 98,5 ml d'eau Ultrapure® à 1 ml de suspension de NP de 60 nm de diamètre et 0,5 ml de suspension de NP de 20 nm de diamètre.

Filtration : Après agitation manuelle, la suspension est divisée en 2 suspensions filles qui sont filtrées sous vide sur des membranes en polycarbonate pré carbonées de 200 et 400 nm de porosité.

Analyse MET : Après évaporation de carbone, les membranes sont transférées sur des grilles de cuivre analysées en MET comme suit:

- vérification d'une répartition homogène des particules à faible grossissement (x 3000),
- prise de 30 photos sur des champs au hasard à grossissement x 30000,
- comptage des particules retenues sur 30 photos permettant de déduire une concentration estimée.

Le taux de perte est calculé en comparant cette concentration à celle des suspensions avant filtration selon la formule suivante :

$$\text{Taux de perte (\%)} = 100 \times (C_{th} - C_e) / C_{th}$$

C_{th} : Concentration théorique

C_e : Concentration estimée

3 répétitions ont été effectuées.

2.3.2.3. Résultats

Les pertes en particules individuelles sont importantes, supérieures à 95% (Tableau 6).

La porosité des filtres influence peu ces pertes. Le taux de perte est plus élevé pour les petites particules.

Porosité des filtres (nm)	Diamètre des NP (nm)	Taux de perte	
		Moyenne	Ecart type
400	20	99.7%	0.3%
	60	97.2%	1.9%
200	20	99.5%	0.5%
	60	95.8%	2.9%

Tableau 6 : Résultats du test de filtration n°1

Les NP sont principalement retenues au niveau des pores, des aspérités du filtre et au niveau des dépôts de carbone (Figure 6).

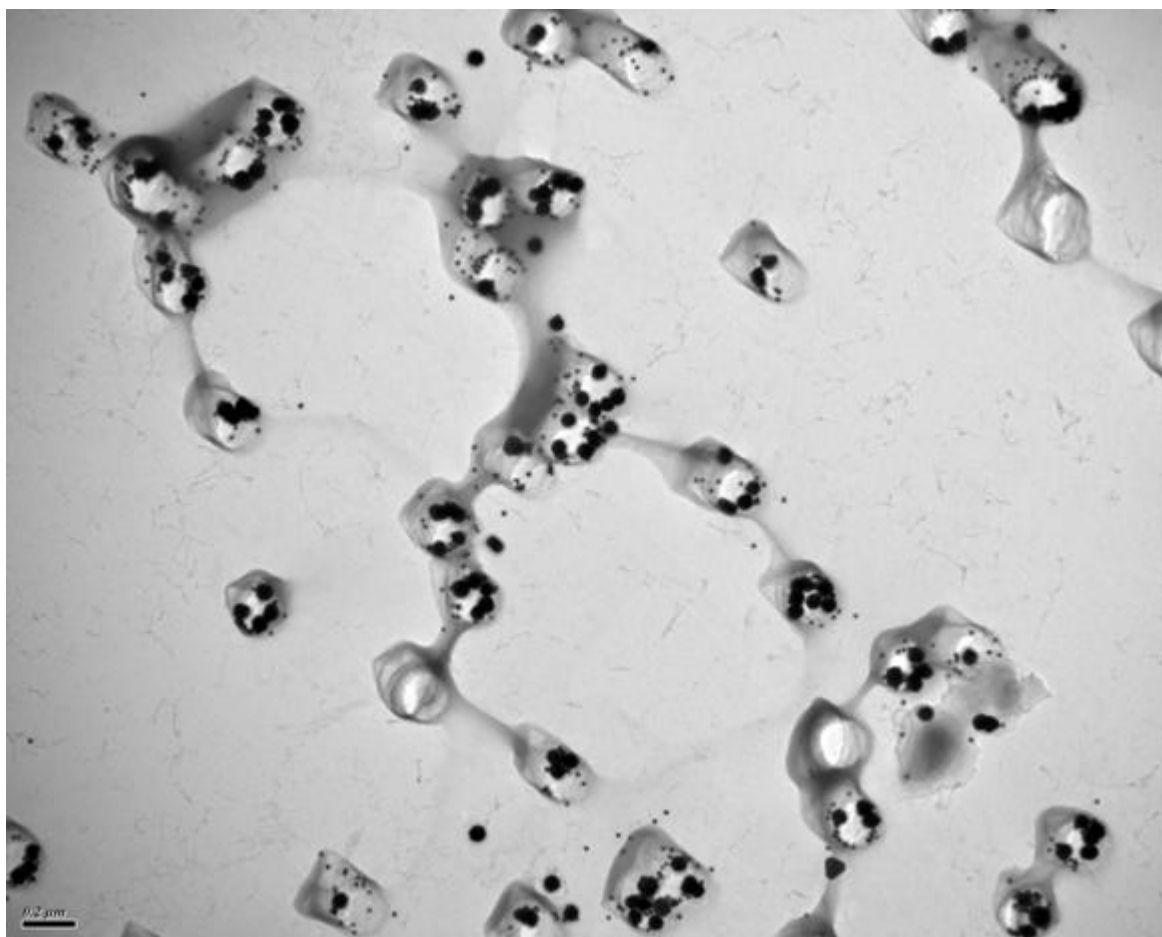


Figure 6 : Répartition des NP d'or de 20 et 60 nm de diamètre sur un filtre de 200 nm de porosité

2.3.3. Test n°2 : Evaluation des pertes en fonction du temps d'évaporation de carbone

2.3.3.1. *Objectifs*

Evaluer l'impact de la durée d'évaporation de carbone sur la filtration et sur le taux de perte.

2.3.3.2. *Protocole*

Le protocole utilisé lors du premier test est répété à l'identique en utilisant pour 2 répétitions supplémentaires des filtres traités avec une évaporation de carbone prolongée (15 et 20 secondes au lieu de 10 secondes).

2.3.3.3. *Résultats*

Avec une durée d'évaporation de carbone prolongée, la couche de carbone obtenue est plus épaisse et les aspérités du filtre sont amplifiées ce qui a pour effet de retenir les particules et de diminuer le taux de perte (Tableau 7). Cependant, compte tenu des difficultés induites par une évaporation de carbone prolongée (transfert sur grille de cuivre de moins bonne qualité et artéfacts qui peuvent gêner l'analyse en MET), la durée de 10 secondes est retenue.

Temps d'évaporation	Taux de perte (%)	
	NP 20 nm	NP 60 nm
10 s (standard)	99.49%	95.76%
15 s	97.95%	94.59%
20 s	88.76%	21.57%

Tableau 7: Taux de perte en NP en fonction du degré d'évaporation de carbone

2.3.4. Test n°3 : test de filtration en suspension dans du digestat

2.3.4.1. *Objectifs :*

- Evaluer le taux de perte en NP dans les conditions du protocole de digestion retenu dans le cadre de l'étude Nanotrans,
- évaluer l'influence de la concentration en NP,

- évaluer l'influence d'un traitement du filtre après filtration selon la méthode décrite par Stettler *et al* (Stettler, Sharpnack, and Krieg 2008).

2.3.4.2. *Protocole*

Les principes du test de filtration en suspension aqueuse sont repris.

Deux méthodes de préparation des échantillons sont testées :

- protocole LEPI modifié : échantillon pulmonaire digéré durant 1h sous agitation orbitale dans 10 ml d'hypochlorite de sodium, microfiltration sous vide avec rinçage par 50 ml d'eau Ultrapure ®,
- protocole Stettler déjà décrit.

Les tests sont réalisés sur du tissu pulmonaire de lapin.

3 répétitions sont réalisées pour chaque méthode avec des échantillons de poids sec comparables compris entre 54,1 mg et 56,5mg.

Après digestion, un volume croissant de suspension de NP d'Or est ajouté comme suit :

- répétition n°1 : 0,1 ml de NP 20 nm + 0,2 ml de NP 60 nm,
- répétition n°2 : 0,2 ml de NP 20 nm + 0,4 ml de NP 60 nm,
- répétition n°3 : 0,4 ml de NP 20 nm + 0,8 ml de NP 60 nm.

Après agitation manuelle, le digestat est filtré sous vide sur des filtres en polycarbonate pré carbonés de 200 nm de porosité.

Après évaporation de carbone, les filtres sont transférés sur des grilles de MET en cuivre.

Ces grilles sont analysées en MET comme décrit précédemment.

2.3.4.3. *Résultats*

Lors de la filtration dans le digestat, entre 15 et 17 fois plus de particules sont récupérées sur les filtres par rapport aux tests en suspension aqueuse. Cela correspond cependant à un taux de perte en NP individuelles qui reste important lors de la microfiltration dans du digestat, globalement supérieur à 90%.

Le taux moyen de perte ne dépend ni du diamètre des NP ni de la méthode de préparation utilisée, il est compris entre 90,03 et 92,46% (Tableau 8).

Méthode de digestion	Diamètre des NP	Taux de perte	
		Moyenne	Ecart type
LEPI modifiée	20	91,67%	4,24%
	60	91,66%	2,53%
Stettler	20	92,46%	2,87%
	60	90,03%	4,93%

Tableau 8 : Résultats du test de filtration n°3, taux de perte en fonction de la méthode de préparation.

Il n'y a pas de corrélation significative pour un risque α inférieur à 1% entre la concentration en NP et le taux de perte lors de filtration (test de corrélation des rangs de Spearman).

2.3.5. Synthèse des tests de filtration

Les principales caractéristiques et les principaux résultats des tests de filtrations réalisés sont synthétisés dans le Tableau 9. Compte tenu des résultats obtenus, il est convenu d'utiliser des filtres de porosité 200 nm et une durée d'évaporation de 10 secondes.

Objectifs	Protocole			Résultats	Commentaires
	Milieu	Filtre	Particules		
Comparer les pertes en fonction de la porosité et de la couche de carbone	Suspension aqueuse	Polycarbonate pré carboné de 200 et 400 nm de porosité	0,5 ml NP d'or 20 nm	Taux de perte > 98,5%	Indépendant de la porosité
			1 ml NP d'or 60 nm	Taux de perte > 97%	
Comparer les pertes en fonction de la durée d'évaporation de carbone	Suspension aqueuse	Polycarbonate pré carboné de 200 nm de porosité Durée évaporation 10, 15, 20 secondes	0,5 ml NP d'or 20 nm	Taux de perte diminuant avec la durée d'évaporation	Durée de 10 secondes préférée pour transfert et comptage
			1 ml NP d'or 60 nm		
Evaluer le taux de perte dans les conditions réelles	Digestat	Polycarbonate pré carboné de 200 nm de porosité	0,1-0,2-0,4 ml NP d'or de 20 0,2-0,4-0,8 ml de NPd'or de 60 nm	Taux de perte environ 92%	—

Tableau 9 : Synthèse des tests de filtration.

2.4. Tests d'ultracentrifugation

2.4.1. Matériel et méthodes utilisés lors des tests d'ultracentrifugation

2.4.1.1. Matériel

Ultracentrifugation

- Ultracentrifugeuse Optima TLX 120000 RPM n° série CTX 01 H13n Rotor TLA 100 (Beckman Coulter Inc),
- Tubes ultracentrifugation Thickwall® en polycarbonate 3,2 ml
- Balance de précision.
- Micropipette
- Sonicateur SONIFIERTM 150 (Branson ultrasonics corporation)
- Eau Ultrapure ® (Fisher scientific)

Préparation des grilles par microgoutte :

- Boite de pétri
- Grilles de cuivre de 200 mesh pré carbonée (transfert d'une membrane de filtration en polycarbonate vierge)
- Eau Ultrapure ® (Fisher scientific)
- Micropipette

2.4.1.2. *Méthode de base*

Ultracentrifugation

Il est possible de centrifuger 8 échantillons simultanément.

3 ml de digestat sont prélevés à la micropipette et mis dans les tubes d'ultracentrifugation.

Les tubes sont équilibrés 2 à 2 au centième de gramme près à la balance de précision par adjonction d'eau Ultrapure ®.

La durée de centrifugation choisie est 30 min à 10°C. La vitesse varie en fonction des tests.

Après centrifugation, le surnageant est éliminé par pipetage puis remplacé par 3 ml d'eau Ultrapure ®.

L'opération est renouvelée 1 fois avec dépôt d'une microgoutte de surnageant la 2^{ème} fois.

A la fin du 2^{ème} cycle, le surnageant est éliminé est remplacé par 0,3 ml d'eau Ultrapure ®.

Après sonication deux grilles sont préparées par microgoutte.

Préparation des grilles par microgoutte

La grille pré carbonée est maintenue à la pince fine. Une microgoutte de 5 µl est déposée sur la grille. La grille est déposée sur une boite de pétri et mise à sécher à température ambiante.

2.4.2. Test n°1 : Tests préliminaires sur des NP d'or

2.4.2.1. *Objectifs*

- Déterminer le protocole d'ultracentrifugation et de préparation des grilles adapté à des suspensions de NP,
- évaluer les biais liés à la centrifugation dans le cadre d'une analyse quantitative de la rétention en NP.

2.4.2.2. *Protocole*

- Préparation de la suspension : 0,1 ml de suspension de NP d'or de 20 nm de diamètre et 0,2 ml de NP d'or de 60 nm de diamètre mises en suspension dans 10 ml d'eau Ultrapure®,
- Protocoles de centrifugation : les principales étapes des protocoles de centrifugation utilisés dans les tests présentés ci-après sont synthétisées dans la Figure 7 :
 - 1^{ère} centrifugation à 30 000 tours par minute (rpm) (soit 33 100 g) de 3 ml de suspension pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et remplacé par 3 ml d'eau Ultrapure®. Le culot est remis en suspension par sonication externe (30 secondes, 5 W).
 - 2^{ème} centrifugation à 30 000 rpm (33 100 g) pendant 20 min. Le surnageant est éliminé (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule) et remplacé par 0,5 ml d'eau Ultrapure®. Le culot est remis en suspension par sonication externe (30 secondes, 5 W).
 - Après sonication, une microgoutte de 5 µl est déposée sur grille de MET carbonée avec un séchage à température ambiante.

Compte tenu de la présence de NP dans le surnageant dans cette première répétition, le test a été reproduit en utilisant une centrifugation à 40 000 rpm (60 100 g). Seuls les résultats de ce test sont présentés.

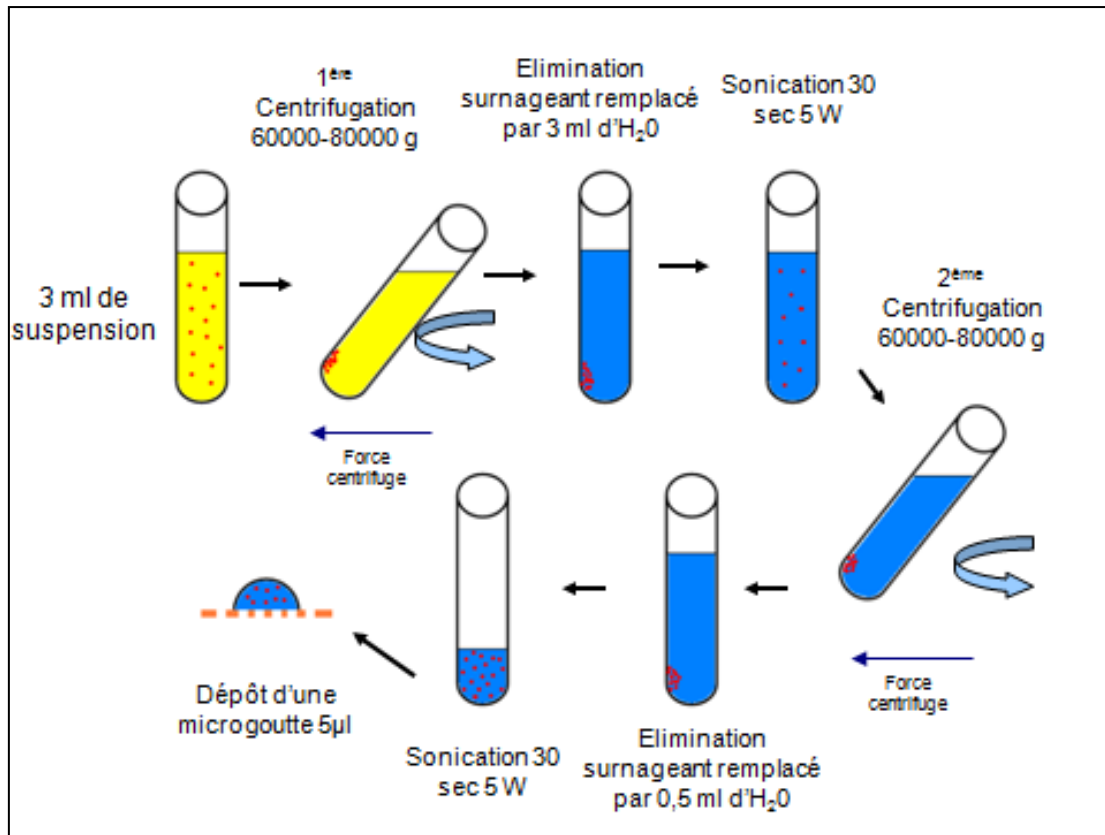


Figure 7 : Schémas récapitulatif des protocoles d'ultracentrifugation

• Analyse en MET

Les grilles sont analysées en MET selon la procédure suivante : vérification de la qualité de la grille puis prise de 10 micrographies au hasard sur chaque grille.

Les NP sont comptées sur chaque photo afin de déduire une concentration estimée. Le taux de perte est calculé à partir de la concentration théorique comme précédemment.

2.4.2.3. *Résultats*

Une première série de centrifugation à 30 000 rpm (33 000 g) a montré la persistance de NP de 20 nm de diamètre dans le surnageant mais pas de NP de 60 nm de diamètre.

Le test a donc été reproduit en utilisant une vitesse de centrifugation de 40 000 rpm (60 100 g) ce qui permet la sédimentation complète des particules d'or.

Les résultats du comptage des NP réalisés sur 10 photos sont représentés dans le Tableau 10.

La centrifugation induit un taux de perte important qui dépend de la taille des NP (89,4% pour les NP de 20 nm et 97,2% pour les NP de 60 nm). Aucune particule n'étant retrouvée dans le surnageant, ces pertes peuvent être liées à :

- des particules qui ont adhéré au tube de centrifugation ou au matériel utilisé pour la préparation de la microgoutte,
- à une agrégation des particules ou une répartition non homogène sur la grille.

	Concentration ($\times 10^9$ p/ml)		Taux de perte
	théorique	mesurée	
NP d'Or 20 nm	22,26	2,36	89.4%
NP d'Or 60 nm	2,88	0,08	97.2%

Tableau 10: Synthèse du premier test d'ultracentrifugation

2.4.3. Test n°2 : Tests préliminaires sur des NP carbonées

2.4.3.1. *Objectifs*

Evaluer l'efficacité de l'ultracentrifugation sur des particules carbonées (Carbon black printex 60, Degussa).

2.4.3.2. *Protocole*

• Préparation des suspensions :

- Suspension mère : suspension à 2 mg/ml de particules de noir de carbone (Carbon black printex 60, Degussa).
- Suspension n°1 : 0,4 ml de la suspension mère mélangée à 3,6 ml d'eau Ultrapure ®. 3 ml de la suspension n°1 sont centrifugés (concentration : 0,2 mg/ml)
- Suspension n°2 : 0,3 ml de la suspension n°1 mélangée à 2,7 d'eau Ultrapure ® (concentration : 0,02 mg/ml)

• Protocole de centrifugation :

Une première série de centrifugation à 40000 rpm (60100 g) a montré la persistance de NP dans le surnageant.

Le test a donc été reproduit en utilisant une vitesse de centrifugation de 45 000 rpm (76 100) selon le protocole suivant :

- 1^{ère} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 3 ml de suspension pendant 30 min. Tout le surnageant est éliminé et remplacé par 3 ml d'eau Ultrapure ®, l'ensemble est agité par sonication (30 sec à 5 Watt),
- 2^{ème} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 3 ml de suspension pendant 30 min. Elimination de tout le surnageant (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule) et remplacé par 0,3 ml d'eau Ultrapure ® l'ensemble est agité par sonication (30 sec à 5 Watt)
- Après agitation, une microgoutte est déposée sur grille de MET pré carbonée et séchée à température ambiante.

• Analyse en MET

L'analyse de la grille en MET est réalisée selon 2 critères :

- critère qualitatif : aspect de la grille,
- critère quantitatif : comptage et contourage des particules retrouvées sur 20 photos prises au hasard sur la grille.

2.4.3.3. *Résultats*

Les particules sont sous la forme d'agrégats de particules individuelles d'environ 40 nm de diamètre. Il n'est pas retrouvé de particules dans le surnageant ce qui confirme l'efficacité de la centrifugation.

La centrifugation a pour effet d'augmenter le degré d'agglomération des particules et donc de diminuer la concentration numérique et la surface développée (Figure 8).

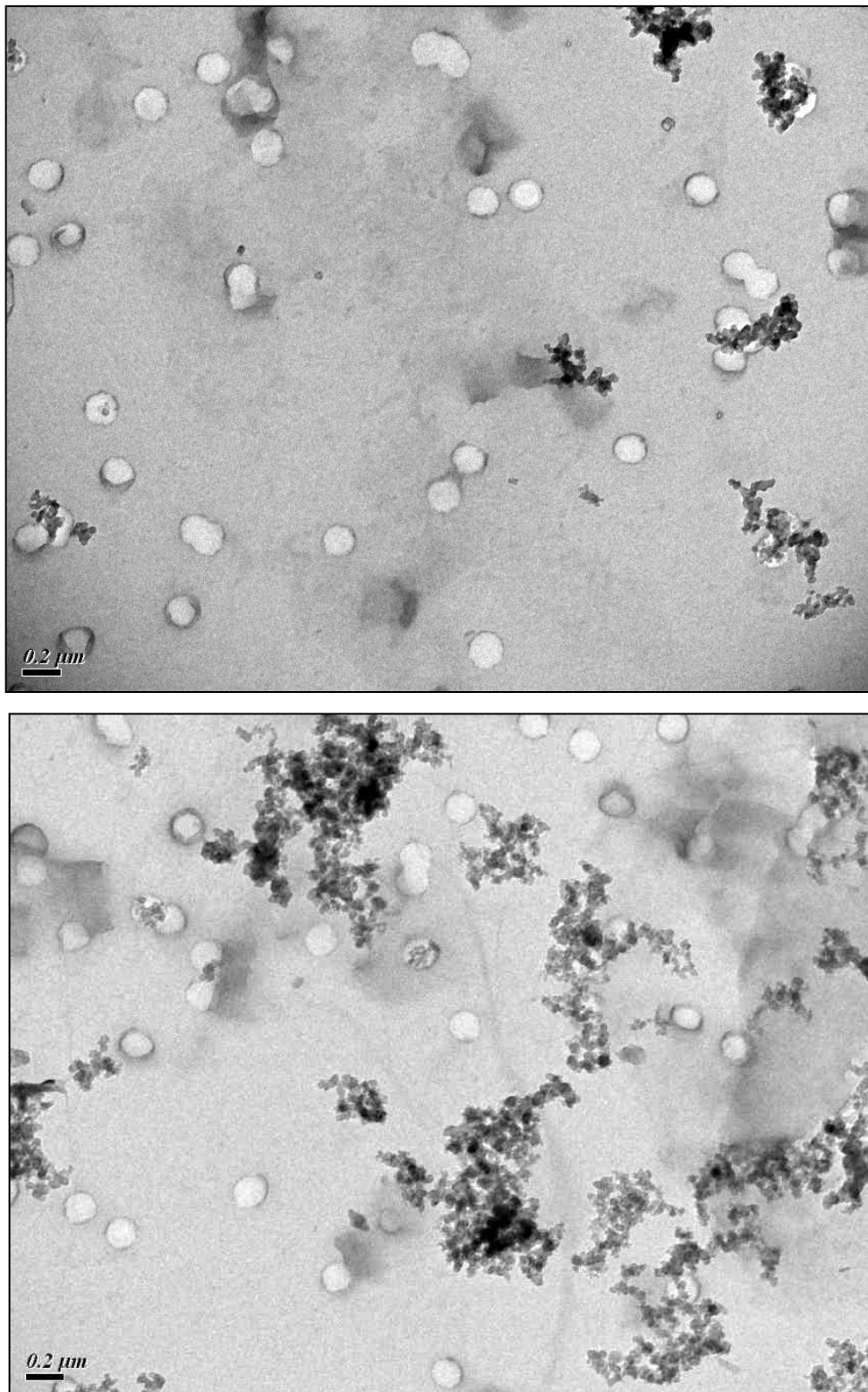


Figure 8 : Aspect des agrégats de NP de Carbon Black en MET avant et après centrifugation (x 30000).

La concentration théorique est calculée en faisant l'analyse de 20 images réalisées sur une microgoutte de la suspension n°1 avant centrifugation.

Aucune particule n'est retrouvée dans le surnageant.

La centrifugation entraîne un biais de sous-estimation de la concentration qui équivaldrait à une perte d'environ 80% des particules. Ce biais parait indépendant de la concentration (Tableau 11).

	Concentration massique (mg/ml)	Concentration en surface (nm ² /ml)		Taux de perte
		Théorique	Mesurée	
Suspension 1	0.2	2.41E+13	4.84E+12	80.0%
Suspension 2	0.02	2.41E+12	4.68E+11	80.6%

Tableau 11 : Résultats du test d'ultracentrifugation sur des suspensions de NP de carbone

2.4.4. Test n°3 : Mise au point d'un protocole d'analyse d'échantillons urinaires

2.4.4.1. *Objectifs*

Evaluer la faisabilité d'une analyse quantitative de nanoparticules métalliques reposant sur l'ultracentrifugation des échantillons et l'analyse en MET de grilles réalisées par dépôt de microgoutte. Ce test a été réalisé afin d'évaluer la possibilité d'inclure dans l'étude Nanotrans l'analyse d'échantillons urinaires.

2.4.4.2. *Protocole*

- Préparation des suspensions : les suspensions ont été préparées afin d'obtenir des concentrations massiques en or comparables aux concentrations massiques en chrome observée dans des échantillons urinaires de travailleurs ayant des activités de traitement de surface de métaux et qui nous ont été transmises par l'INRS. Les chromuries étaient de l'ordre de 100 µg/l.

Les suspensions ont été préparées comme suit :

- dilution de 1 ml de suspension de NP d'or de 20 nm de diamètre dans 9 ml d'eau Ultrapure = suspension 1 :
 - urine 1 : 9,98 ml d'urine de témoin + 20 μ l de suspension 1 soit 1,1 μ g d'or/ml,
 - urine 2 : 9,8 ml d'urine de témoin + 200 μ l de suspension 1 soit 11,3 μ g d'or/ml,
 - urine 3 : 8 ml d'urine de témoin + 2000 μ l de suspension 1 soit 113,2 μ g d'or/ml.

• Protocole de centrifugation :

- 1^{ère} centrifugation à 40 000 rpm (60 100 g) de 3 ml de suspension pendant 30 min. 2,5 ml de surnageant sont éliminés et remplacés par 2,5 ml d'eau Ultrapure®, l'ensemble est agité par sonication (30 sec à 5 Watt),
- 2^{ème} centrifugation à 40 000 rpm (60 100 g) de 3 ml de suspension pendant 30 min. Elimination de tout le surnageant (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule), remplacé par 0,3 ml d'eau Ultrapure®, l'ensemble est agité par sonication (30 sec à 5 Watt),
- après sonication, une microgoutte de 5 μ l est déposée sur grille de MET carbonée avec un séchage à température ambiante.

• Analyse en MET

L'analyse est réalisée selon 2 critères :

- qualitatif : aspect de la grille,
- quantitatif : comptage et un contourage des particules retrouvées sur 20 photos prises au hasard sur la grille.

2.4.4.3. *Résultats*

Les images obtenues montrent un fond de bonne qualité compatible avec un comptage. Il faut noter la présence de particules cristallines provenant du sédiment urinaire de taille variable généralement supérieure à 500 μ m (Figure 9).

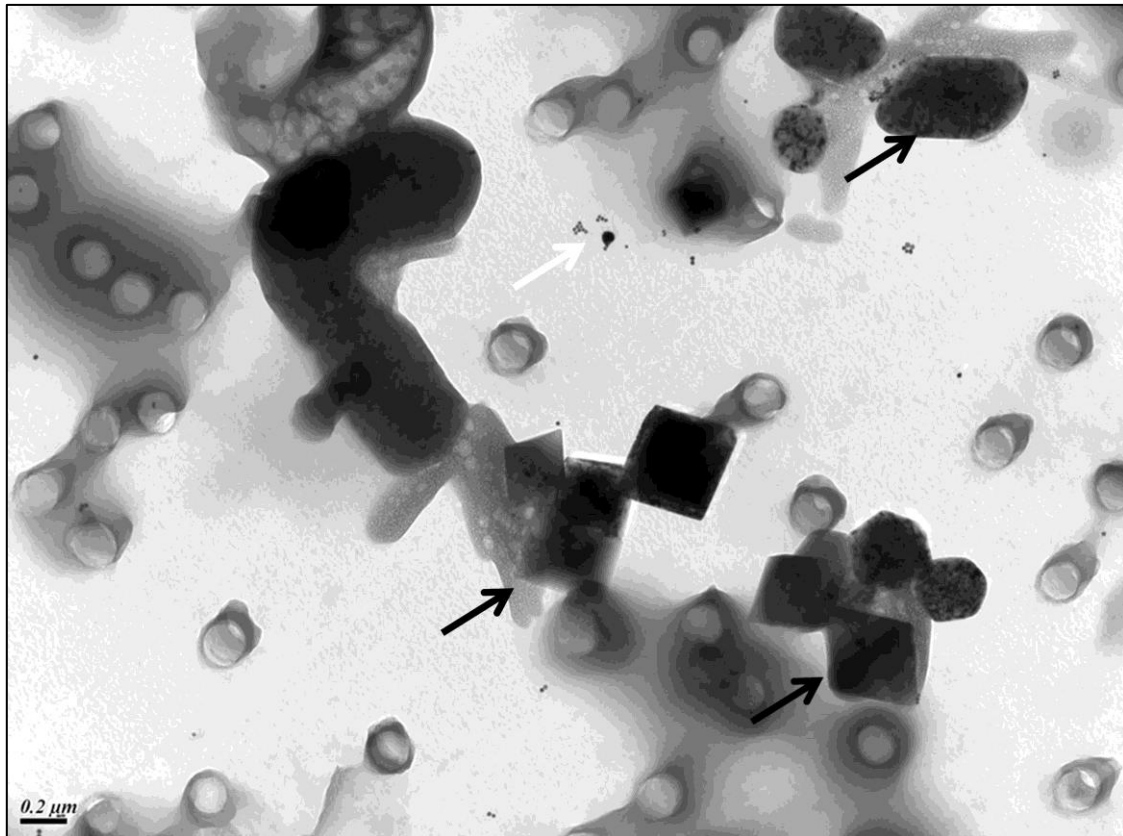


Figure 9 : Aspect en MET à grossissement x 30000 de la suspension C (flèches noires : particules minérales cristallines, flèches blanches : nanoparticules)

Les concentrations estimées par comptage et les concentrations théoriques des différents échantillons sont représentées dans la Figure 10 :. On observe un taux de perte relativement constant de respectivement 84.5%, 88.6% et 71.2% pour les échantillons urinaires 1, 2 et 3 qui est compatible avec une expression semi-quantitative des résultats.

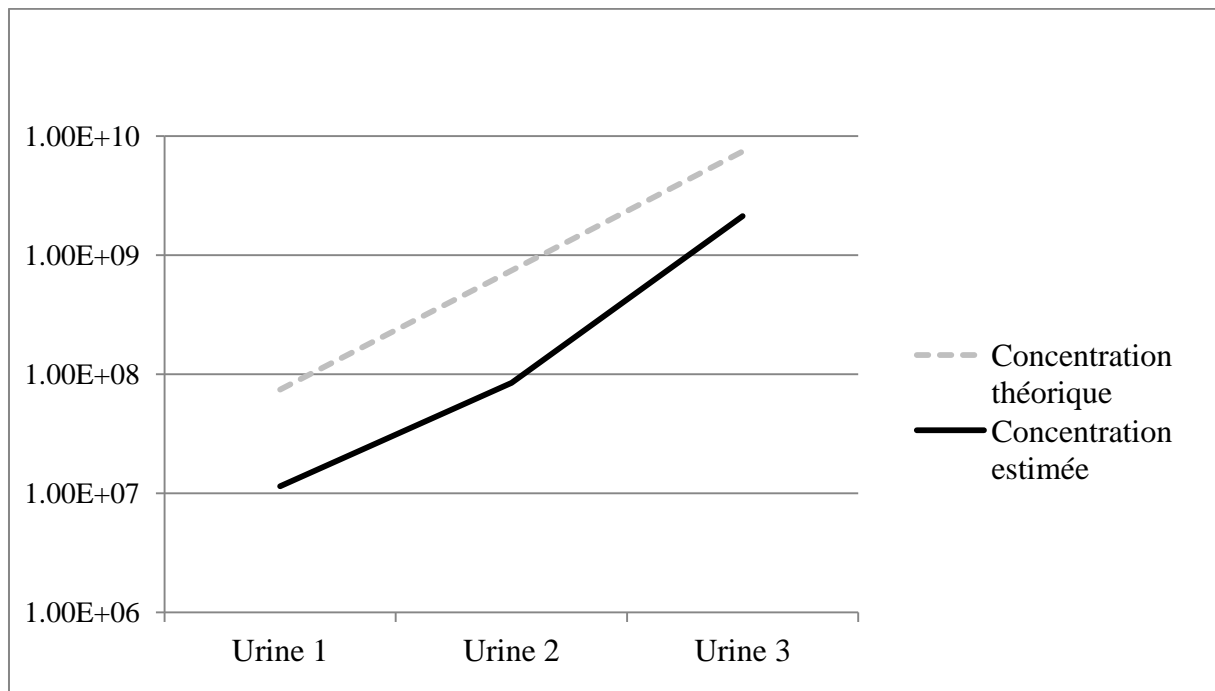


Figure 10 : Résultats du test d'ultracentrifugation n°3

2.4.5. Test n°4: Ultracentrifugation de suspensions de NP dans le digestat

2.4.5.1. *Objectif*

Evaluer la faisabilité d'une analyse quantitative reposant sur l'ultracentrifugation de suspensions de NP d'or et de carbone dans du digestat et le comptage de ces particules sur des grilles préparées par dépôt de microgoutte.

2.4.5.2. *Protocole*

• Préparation des suspensions :

- Suspensions mères :

- digestat : un échantillon de 806 mg (poids humide) de parenchyme pulmonaire fœtal (sujet F0927) est digéré dans 40 ml d'hypochlorite de sodium sous agitation magnétique pendant 1h,
- suspension de particules de noir de carbone (Carbon black printex 60, Degussa) à 0,2 mg/ml
- suspension de NP d'or de 20 nm diluée au 1/10 (soit $1,04 \times 10^{10}$ particules/ml et 5,7 $\mu\text{g/ml}$ d'or).

Six suspensions sont préparées à partir des solutions mères selon les modalités résumées dans le Tableau 12.

	Digestat (ml)	Carbon Black (µl)	NP d'or (µl)
1	2	1	0
2	2	10	0
3	2	100	0
4	2	0	1
5	2	0	10
6	2	0	100

Tableau 12: Composition des 6 suspensions du test de centrifugation n°4

• Protocole de centrifugation n°1:

- 1^{ère} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 2 ml de suspension pendant 30 min :
 - tout le surnageant est éliminé et remplacé par 2,9 ml d'eau Ultrapure ®,
 - l'ensemble est agité par sonication (30 secondes à 5 Watt).
- 2^{ème} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 2 ml de suspension pendant 30 min :
 - élimination de tout le surnageant (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule) et remplacé par 0,5 ml d'eau Ultrapure ®,
 - l'ensemble est agité par sonication (1 min à 5 Watt).
- Après agitation, une microgoutte est déposée sur grille de MET carbonée avec un séchage à température ambiante

• Protocole de centrifugation n°2:

- 1^{ère} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 2 ml de suspension pendant 30 min :
 - 0,2 ml de surnageant sont prélevés, le reste de surnageant est éliminé, rajout de 1,8 ml d'eau Ultrapure ®,
 - l'ensemble est agité par sonication (30 secondes à 5 Watt),
- 2^{ème} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 2 ml de suspension pendant 30 min,

- élimination de tout le surnageant (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule) et remplacé par 2 ml d'eau Ultrapure ®,
- l'ensemble est agité par sonication (1 min à 5 Watt),
- 3^{ème} centrifugation à 45 000 rpm (76 100 g) de 2 ml de suspension pendant 30 min.
 - élimination de tout le surnageant (une microgoutte de surnageant est déposée sur grille de MET pour s'assurer de l'absence de particule) et remplacé par 0,2 ml d'eau Ultrapure ®,
 - l'ensemble est agité par sonication (1 min à 5 Watt).
- Après agitation, une microgoutte est déposée sur grille de MET carbonée avec un séchage à température ambiante.

• Analyse en MET

40 photos sont prises au hasard au grossissement x 30 000. Les NP d'or sont comptées et les résultats sont exprimés en concentration numérique (n particules/ml). Les NP de noir de carbone sont contourées et les résultats sont exprimés en surface développée par ml (nm²/ ml). Le taux de perte est calculé selon la formule déjà décrite.

2.4.5.3. *Résultats*

Les premières tentatives réalisées avec le protocole de centrifugation n°1 ont montré que contrairement aux particules d'or, les particules de carbones ne sédimentent pas et s'accumulent en surface du surnageant.

Le test a été répété en récupérant 0,2 ml du surnageant (protocole de centrifugation n°2). Cette étape étant à l'origine de nombreux artefact lors du séchage, l'ajout d'une 3^{ème} centrifugation a été testé. Malgré cette 3^{ème} centrifugation, le comptage en MET est gêné par la présence d'importants artefacts lors du séchage (Figure 11), qui rendent difficile le repérage et le comptage des NP.

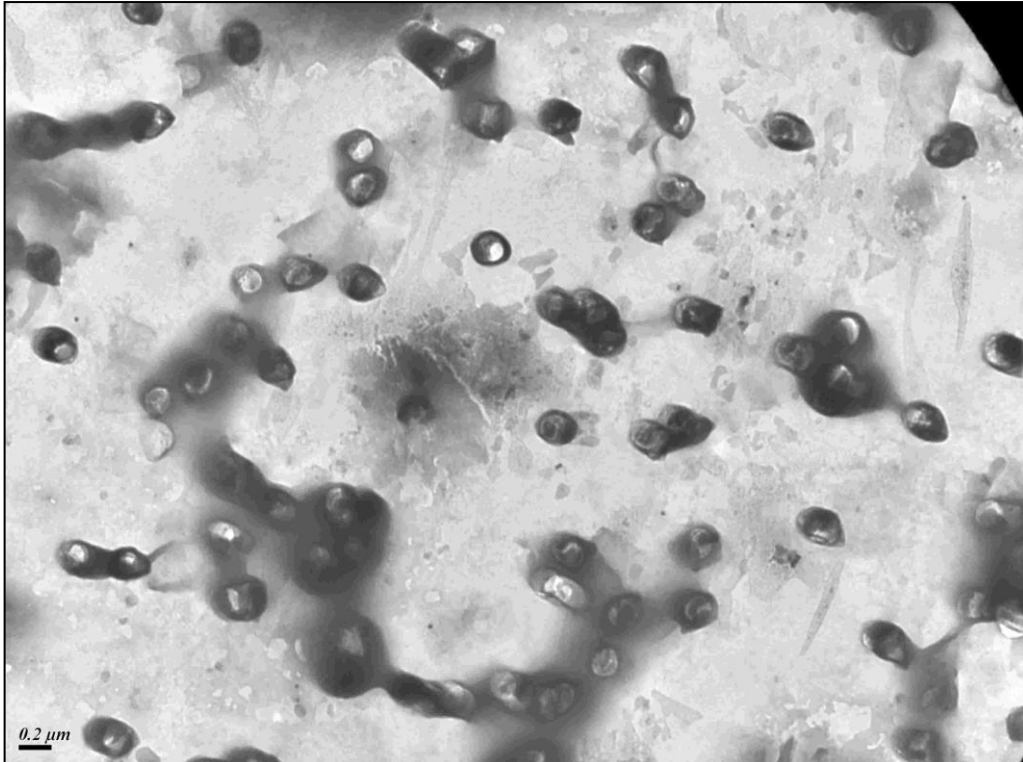


Figure 11: Micrographie en MET à grossissement x 30000 d'une microgoutte de la suspension de NP d'or et de noir de carbone dans le digestat après centrifugation.

Par ailleurs l'ajout d'une 3^{ème} centrifugation induit des pertes plus importantes avec un taux de perte qui est très variable notamment pour les NP de Carbone. Ce taux était respectivement de 98,4%, 89,4% et 98,1% pour les suspensions n°1, 2 et 3. Ce taux est également élevé pour les NP d'or mais plus constant respectivement de 98%, 96,8% et 97,9% pour les suspensions 4, 5 et 6.

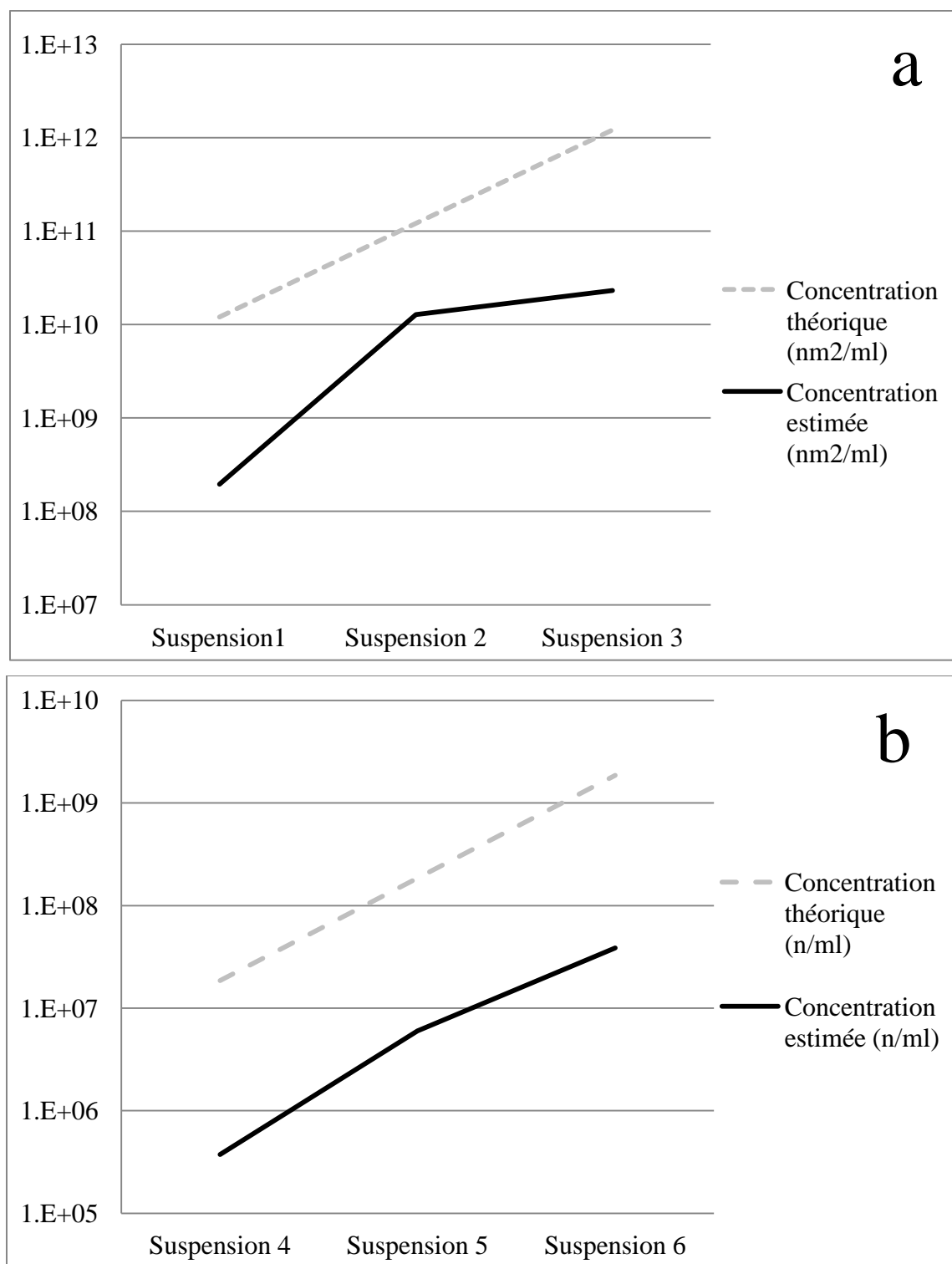


Figure 12 a et b: Résultats du test de centrifugation n°4 (a: NP de noir de carbone, b: NP d'or)

2.4.1. Synthèse des résultats des tests de centrifugation

Une synthèse des principaux résultats des tests de centrifugation est présentée dans le Tableau 13. Compte tenu de ces tests, la méthode de microfiltration est préférée par rapport à l'ultracentrifugation pour la mise au point du protocole Nanotrans dans la mesure où un intérêt particulier est porté aux particules ultrafines de carbone.

	Objectif	Matériel et méthode			Résultats	Commentaires
		Milieu	Protocole ultracentrifugation	Particules		
Test 1	Déterminer le protocole de centrifugation Evaluer les pertes en NP métalliques	Suspension aqueuse	30000 RPM (33100 g) 20 min x2 40000 RPM (60100 g) 20 min x2	NP d'Or 20 nm NP d'Or 60 nm	Taux de perte important > 89%	Taux de perte dépendant de la taille des NP
Test 2	Déterminer le protocole de centrifugation Evaluer les pertes en NP de carbone	Suspension aqueuse	40000 RPM (60100 g) 30 min x2 45000 RPM (76100 g) 30 min x2	NP noir de carbone	Taux de perte environ 80%	Augmentation de l'agrégation
Test 3	Tester la quantification de NP dans l'urine par centrifugation	Urine	40000 RPM (60100 g) 30 min x2	NP d'or 20 nm	Taux de perte compris entre 71 et 89%	Taux relativement constant compatible avec une étude semi quantitative
Test 4	Tester la quantification de NP dans le digestat par centrifugation	Digestat	45000 RPM (76100 g) 30 min x 3	NP d'or 20 nm NP de noir de carbone	Taux de perte environ 98% pour les NP d'Or - variable pour les NP de CB	Artéfact ++

Tableau 13 : Synthèse des tests de centrifugation

2.5. Mise au point du protocole d'analyse en microscopie électronique

2.5.1. Protocole initial

Comme expliqué en introduction, il n'existe pas de méthode de référence pour l'analyse de la rétention en particules de taille nanométrique dans les tissus ou fluides biologiques.

Pour l'évaluation de la rétention du tissu pulmonaire en particules micrométriques fibreuses ou non fibreuses, le laboratoire d'étude des particules inhalées de la ville de Paris (LEPI) utilise une méthode dérivée de la méthode de comptage des particules d'amiante en microscopie électronique, qui fait l'objet d'une norme française : NFX43-050 (AFNOR 1996). Le protocole complet de cette méthode est présenté en annexe 1. Elle repose donc sur la microscopie électronique à transmission, technique dans laquelle une image est obtenue à partir d'un faisceau d'électron qui a traversé l'échantillon analysé. Les images obtenues ont une résolution théorique de l'ordre de l'Angström (0,1 nm).

Lors de l'interaction du faisceau d'électron avec l'échantillon, des photons X caractéristiques des éléments chimiques présents sont émis. La spectroscopie par dispersion d'énergie des rayons X (EDX) repose sur l'analyse de ces photons. Elle permet d'obtenir un spectre reflétant la composition élémentaire de l'échantillon pour les échantillons de numéro atomique supérieur à celui du bore. Un exemple de spectre réalisé sur un filtre sans particule est présenté dans la Figure 13. L'unité de l'abscisse est l'électron-volt, l'unité de l'ordonnée est le nombre de coup par minute détectée par la sonde. Sur le spectre on observe les pics liés au bruit de fond dû à la couche de carbone déposée par évaporation lors de la préparation et au cuivre des grilles de MET.

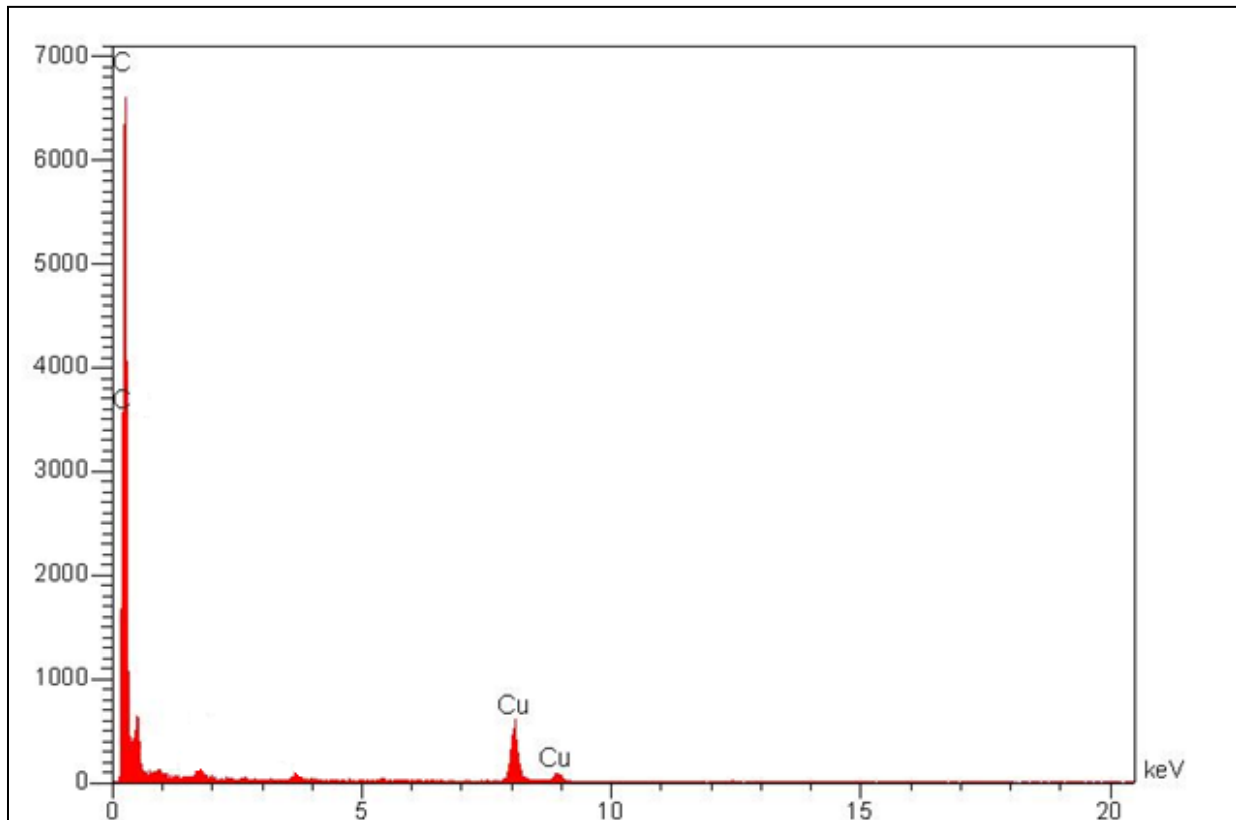


Figure 13 : Exemple de spectre EDX réalisé sur un filtre sans particule.

Les principales étapes de l'analyse en MET sont les suivantes :

- le nombre de champs à analyser est calculé en fonction de la sensibilité analytique voulue,
- les particules sont mesurées approximativement et comptées en direct au microscope électronique, ce qui permet de calculer leur concentration numérique exprimée en nombre de particules par unité de poids sec,
- 50 particules prises au hasard sont analysées en EDX pour en déduire un profil minéralogique.

Cette méthode de comptage en direct a été testée à l'occasion d'un travail de master ¹ dont l'objectif était de quantifier les PUF dans des échantillons pulmonaires fœtaux. Ce travail a

¹ Rinaldo M Particules ultrafines et contamination fœtale-Mise au point de la méthode d'analyse des particules

révélé que le comptage en direct n'est pas adapté à l'analyse des particules de taille nanométrique notamment en raison :

- d'un temps d'analyse très long induit par le travail à fort grossissement (x 30 000),
- de l'intérêt de recueillir des données sur la surface développée. En effet, les données de la littérature indiquent qu'elle est mieux corrélée aux effets sur la santé que la concentration numérique (Kendall and Holgate 2012). Le calcul de cette surface n'est pas possible dans le cadre d'un comptage en direct.

2.5.2. Mise au point du protocole

Compte tenu des limites du protocole initial, un protocole d'analyse en MET spécifique aux particules de taille nanométrique a été élaboré. Le protocole détaillé est présenté ci-après (paragraphe 2.6).

Il repose sur une analyse en MET en deux étapes :

- 1^{ère} étape : quantification des particules par analyse d'image de micrographies numérisées prises au hasard en MET avec un grossissement x30 000. Les particules sont contourées avec un logiciel d'analyse d'image (Image J 1.44, NIH). Ce contourage permet d'obtenir le diamètre (diamètre de ferret), des indicateurs morphologiques (par exemple la sphéricité) et la surface développée des particules. Les particules sont classées en particules individuelles, agrégats et fibres,
- 2^{ème} étape : analyse en spectroscopie par dispersion d'énergie des rayons X (EDX) sur n particules pour déduire un profil de composition chimique pour chaque classe de particules.

2.5.3. Test de faisabilité sur six patients

2.5.3.1. *Objectif*

Tester la faisabilité de l'analyse quantitative par analyse d'image et la pertinence des données recueillies sur des grilles de MET préparées par le LEPI.

2.5.3.2. Protocole

Le protocole a été testé sur des grilles provenant du LEPI. Ces grilles proviennent de six patients dont les échantillons de parenchyme pulmonaire ont été préparés par digestion alcaline selon le protocole habituel du LEPI. Parmi ces six patients :

- deux patients ne présentent à priori aucune exposition professionnelle à des NP,
- quatre patients ont eu une activité professionnelle comportant des activités de soudure.

Les particules contenues dans les fumées de soudure sont des PUF métalliques qui ont un aspect caractéristique en microscopie électronique comme représenté dans la Figure 14.

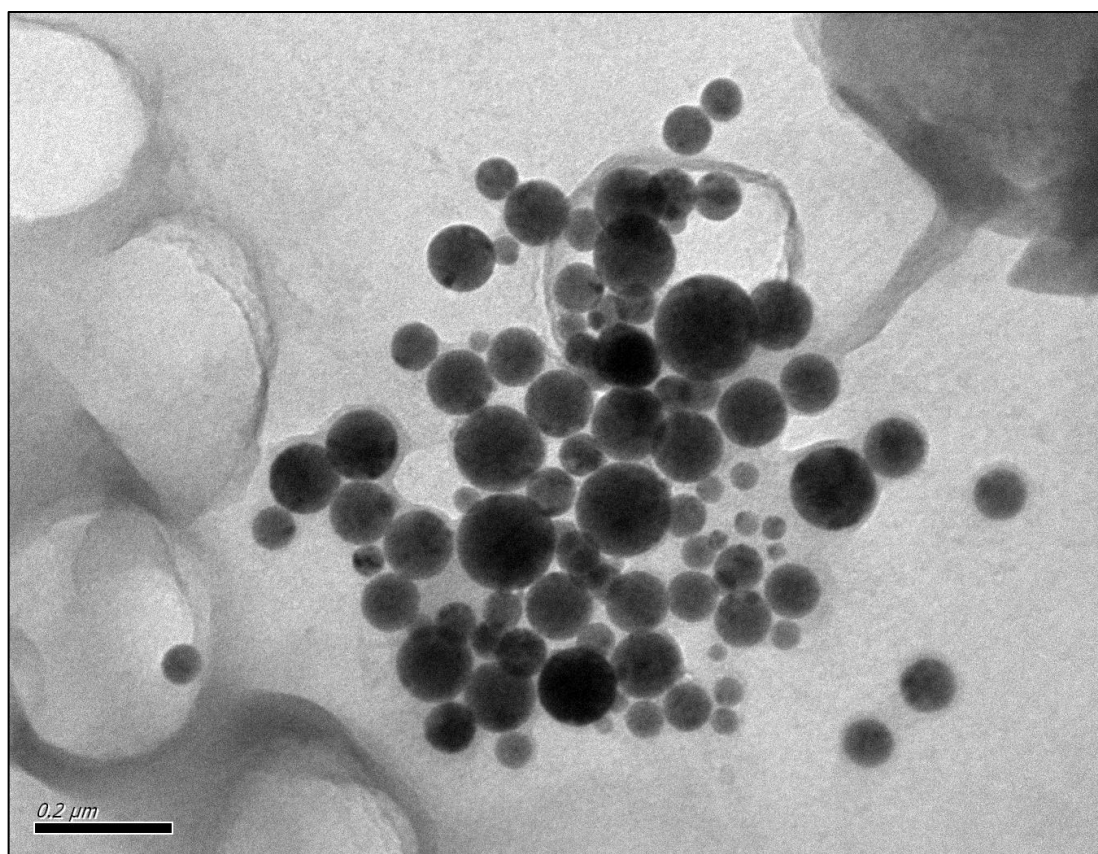


Figure 14 : Aspect caractéristique de particules ultrafines d'aluminium retrouvées dans un échantillon pulmonaire de soudeur (grossissement : x 80000)

2.5.3.3. *Résultat*

Ce test a permis de démontrer la faisabilité du protocole et de calculer le temps nécessaire à l'analyse des grilles :

- analyse des grilles en MET + temps de prise et d'enregistrement des micrographies de deux grilles d'un patient: environ 1h30,
- analyse d'image de 50 micrographies: entre 2 et 3h en fonction de la charge particulaire.

Les premiers résultats obtenus ont permis de confirmer qu'il n'y a pas de corrélation entre les concentrations numériques et les surfaces totales développées par les particules (test de corrélation des rangs de Spearman). Cette absence de corrélation s'explique par une grande variabilité de la surface moyenne observée pour les particules ou les agrégats (Tableau 14).

Par ailleurs, la rétention en particule exprimée en concentration numérique totale ou en surface développée totale par unité de poids ne semblait pas être un facteur discriminant permettant de différencier un patient soudeur d'un témoin ce qui devra être confirmé sur un échantillon plus large de témoins.

	Concentration numérique : x 10⁹/g de poids sec.	Surface développée mm²/g de poids sec	Surface moyenne x10³nm²
Soudeur 1	14,5	573,4	39,0
Soudeur 2	14,5	958,3	65,6
Soudeur 3	6,9	646,2	93,9
Soudeur 4	11,6	1064,6	90,9
Non exposé 1	41,1	730,3	16,9
Non exposé 2	30,0	4177,4	138,8

Tableau 14 : Concentration en particules des échantillons analysés lors du test de faisabilité (concentration numérique et surface développée obtenues par analyse d'image).

En revanche, l'analyse d'images prises au hasard sur les grilles permet bien de retrouver un excès de NP métalliques (fumées de soudure) chez trois soudeurs (Tableau 15).

La composition chimique de ces particules en EDX était variable : fer, aluminium, alliages de métaux composés (fer, chrome, manganèse)).

	Totale	Agrégats	Particules individuelles	Particules métalliques
Soudeur 1	573,4	566,0	6,0	88,8
Soudeur 2	958,3	953,0	5,4	97,0
Soudeur 3	1064,6	1059,0	5,6	3,2
Soudeur 4	1222,6	1209,7	12,9	993,5
Non exposé 1	730,3	692,9	37,4	2,8
Non exposé 2	4177,4	4167,0	3,9	0,0

Tableau 15 : Concentration en particules exprimée en surface développée par unité de poids sec (mm²/g) lors du test de faisabilité

2.6. Protocole d'analyse NANOTRANS

L'ensemble des tests réalisés a permis de mettre au point le protocole Nanotrans présenté ci-après.

2.6.1. Protocole de préparation des échantillons

2.6.1.1. Protocole de microfiltration

• Matériel et réactifs utilisés

- digestion :
 - agitateur orbital (Rotamax, Heidolph),
 - balance de précision,
 - hypochlorite de sodium à 9,6% de chlore actif filtré (sur filtre polyester de 0,4 µm de porosité),
- filtration
 - membranes de filtration en polycarbonate de 0,2µm de porosité (Whatman®),
 - évaporateur de carbone sous vide,

- unités de filtration avec support en verre fritté de 47 mm diamètre (filtration). Deux fioles à vides distinctes sont utilisées pour la purification des réactifs et la filtration des échantillons,
- filtres Millex ® 25 mm de diamètre, 0,22 µ de porosité (Millipore®),
- eau Ultrapure ® (Fisher scientific),
- préparation des grilles par transfert doux:
 - boîte de Pétri,
 - support de filtration en inox de 47 mm de diamètre (Millipore®),
 - papier filtre sans cendre (Whatman®),
 - grilles de cuivre repérées de 200 mesh (Agar scientific®),
 - chloroforme qualité HPLC (Fisher scientific®).
- Traitement des échantillons
 - pesée
 - le prélèvement est déposé sur une boîte de Pétri,
 - deux échantillons sont prélevés et pesés à la balance de précision pour obtenir les poids humides PH₁ et PH₂,
 - le morceau n° 2 est mis à sécher à l'étuve à environ 60°C pendant 24 h puis est pesé pour obtenir le PS₂ (PS = Poids Sec),
 - Calcul du poids sec : $PS_1 = PH_1 \times PS_2 / PH_2$,
 - digestion
 - le morceau n°1 est rincé à l'eau distillée puis placé dans un erlenmeyer avec 10 ml d'hypochlorite de sodium refiltrés à la seringue et au filtre Millex (hypochlorite préalablement chauffée à 40°C),
 - la digestion se fait sous agitation orbitale durant au minimum 1 h à température ambiante. Pour les échantillons de plèvre, en fin de digestion, 5 ml d'isopropanol sont ajoutés avec agitation manuelle,
 - un blanc est préparé selon le même mode opératoire,
 - durant la digestion, les erlenmeyers sont protégés par un parafilm®,
 - filtration
 - les filtrations sont effectuées sur une rampe de filtration permettant la filtration simultanée de 3 digestats,
 - 5 échantillons et un blanc sont donc filtrés par série de filtration,

- l'unité de filtration est rincée à l'eau distillée filtrée avant utilisation,
- le support en verre fritté est humidifié avec de l'eau Ultrapure ®,
- la membrane de filtration prétraitée à l'évaporateur de carbone est déposée sur le support à l'aide d'une pince Millipore (face brillante carbonée sur le dessus),
- le digestat est filtré par aliquote d'environ 5 ml alternant avec 10 ml de rinçage,
- en fin de filtration, l'entonnoir et l'erlenmeyer sont rincés avec de l'eau : environ 50 ml d'eau sont utilisés par prélèvement pour le rinçage,
- durant la filtration, les béchers, l'éprouvette et l'unité de filtration sont protégés par un parafilm®,
- le filtre est prélevé avec une pince Millipore, déposé dans un Petrislide®, préalablement étiqueté et mis à sécher environ 5 minutes à l'étuve.

2.6.1.2. Préparation des grilles par transfert

La technique utilisée est la technique du laveur de Jaffe :

- après séchage, une deuxième couche de carbone est déposée sur les membranes (évaporateur de carbone : durée environ 10 sec),
- un papier filtre sans cendre Whatman® est déposé sur un support de filtration en inox dans une boîte de pétri,
- des grilles de MET en cuivre de 200 mesh repérées sont déposées sur le papier filtre,
- 2 ml de chloroforme sont ajoutés afin de saturer le papier filtre,
- un fragment de membrane est déposé sur le papier filtre,
- après dissolution complète du filtre et évaporation du chloroforme les grilles sont archivées dans des gridbox.

2.6.2. Protocole d'analyse en MET

Deux protocoles sont utilisés en fonction de la charge des tissus en NP :

- protocole n°1: rétention élevée en particules (parenchymes pulmonaire, plèvre),
- protocole n°2: rétention faible (organes périphériques).

2.6.2.1. *Protocole n°1*

- 1^{ère} étape : comptage des particules - évaluation de la rétention en particule
 - Contrôle à faible grossissement pour évaluer la qualité du transfert et l'aspect général de la grille,
 - prise de 50 micrographies au grossissement x 30000 selon une grille de coordonnées préenregistrées,
 - analyse des 50 micrographies à l'aide du logiciel d'analyse d'image Image J 1.44 et d'une tablette graphique (Bamboo pen CTL- 460, Wacom®). Chaque particule est comptée et contourée pour obtenir :
 - son plus grand diamètre en nm,
 - sa surface projetée en nm²,
 - des indicateurs morphologiques (sphéricité, circularité),
 - pour chaque particule comptée, un critère d'aspect est noté :
 - particule individuelle,
 - agrégat,
 - fibre,
 - calcul de la rétention en particules exprimée en :
 - surface totale développée par les particules par unité de poids sec (mm²/ g de poids sec),
 - concentration numérique (nombre de particules / g de poids sec).
 - analyse des blancs selon le même protocole pour s'assurer que le bruit de fond est négligeable.
- Analyse de la composition chimique : profil minéralogique

Cette analyse repose sur la spectrométrie X à dispersion d'énergie (EDX).

- les analyses sont conduites avec une tension d'accélération de 100 kV, une inclinaison de l'échantillon avec un angle de tilt de 7° et un temps d'acquisition de 60 à 200 secondes,
- le spectromètre collecte les rayons X générés par l'interaction du faisceau d'électrons avec la surface de l'échantillon,

- ces rayons sont analysés et classés par énergie afin de produire un spectre permettant de détecter les éléments plus lourds que le bore,
- le spectre permet de classer la particule selon trois classes:
 - o particules minérales,
 - o particules carbonées,
 - o particules métalliques.

2.6.2.2. Protocole n°2

- contrôle à faible grossissement pour évaluer la qualité du transfert et l'aspect général de la grille,
- analyse de deux ouvertures à grossissement x30000: l'ensemble des particules détectées sont classées, photographiées et analysées en EDX,
- analyse des micrographies à l'aide du logiciel d'analyse d'image Image J 1.44 et d'une tablette graphique (Bamboo pen CTL-460, Wacom®). Chaque particule est comptée et contourée pour obtenir :
 - o son plus grand diamètre en nm,
 - o sa surface projetée en nm²,
 - o des indicateurs morphologiques (sphéricité, circularité),
 - o pour chaque particule comptée, un critère d'aspect est noté :
 - particule individuelle,
 - agrégat,
 - fibre.
- calcul de la rétention en particules exprimée en
 - o surface totale développée par les particules par unité de poids sec (mm²/ g de poids sec),
 - o la concentration numérique (nombre de particules / g de poids sec).
- analyse de blanc afin de calculer le bruit de fond lié à la présence de particules fines ou ultrafines dans les réactifs ou de possibles contaminations par les particules de l'air lors de la préparation des échantillons. Les blancs systématiquement réalisés à chaque série de filtration sont analysés suivant les mêmes modalités.
- correction des concentrations mesurées pour chaque classe de particule selon la formule suivante : $Concentration_{\text{corrigée}} = Concentration_{\text{mesurée}} - Concentration_{\text{Blanc}}$.

Un schéma récapitulatif résumant les modifications apportées au protocole LEPI pour mettre au point le protocole Nanotrans est présenté dans la Figure 15.

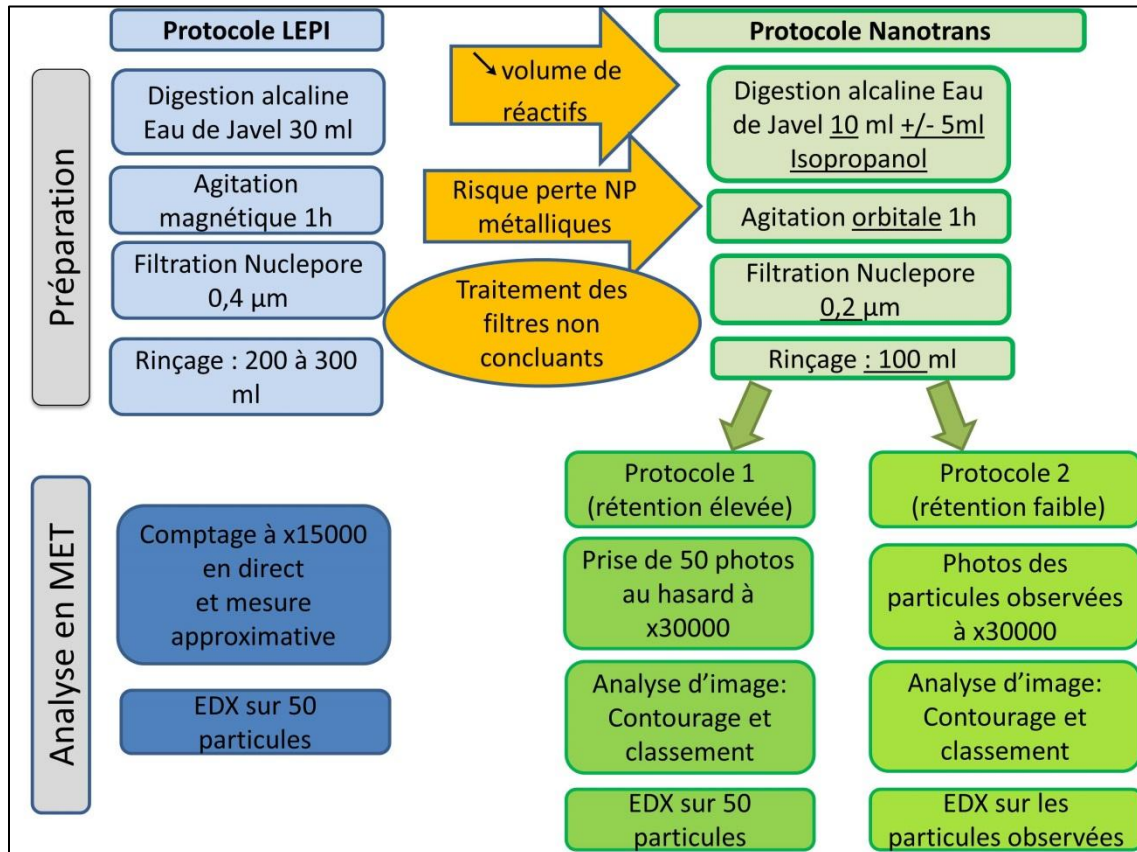


Figure 15 : Comparaison des protocoles LEPI et Nanotrans.

2.7. Validation du protocole Nanotrans par des tests d'inter comparaison

2.7.1. Description du panel

La variabilité inter opérateur et la faisabilité du protocole ont été testées à l'occasion d'une réunion du groupe de travail créé dans le cadre de l'étude Nanotrans. Ce groupe de travail réunissait un panel de 5 personnes entrainées à l'analyse de particules fines et ultrafines dans des échantillons biologiques ou des échantillons d'air réunion à l'occasion d'une journée dévolue aux tests d'inter comparaison au LEPI. Il comprenait :

- Pascal Dumortier, responsable du laboratoire de minéralogie de l'hôpital Erasme, Bruxelles,
- Xavier Janson, technicien au LEPI, Paris

- Laurent Martinon, ingénieur au LEPI, Paris,
- Elisabeth Sellier, ingénieure au CREMEM, Bordeaux,
- Mickaël Rinaldo, doctorant.

2.7.2. Evaluation de la variabilité inter opérateur lors du contourage

2.7.2.1. *Protocole*

Quatre photos réalisées à grossissement x30000 dans le cadre de l'étude de faisabilité sur des échantillons pulmonaires de patients soudeurs ont été sélectionnées.

Les cinq participants ont contouré tous les objets qu'ils identifiaient comme des particules en utilisant le logiciel Image J 1.43u. Ce contourage était fait:

- avec une tablette tactile (Bamboo pen CTL-460, WACOM) pour deux opérateurs (Rinaldo et Martinon),
- avec une souris pour les autres.

2.7.2.2. *Résultats*

L'estimation de la surface développée des particules est reproductible avec des résultats comparables entre les opérateurs qui retrouvent une surface moyenne de $1,25 \times 10^6 \text{ nm}^2$ sur les quatre photos. L'écart-type était de $0,13 \times 10^6 \text{ nm}^2$ ce qui représente une marge d'erreur de +/- 17,6%. Cette marge d'erreur varie en fonction des photos de 8,5 à 30,1%. (Figure 16)

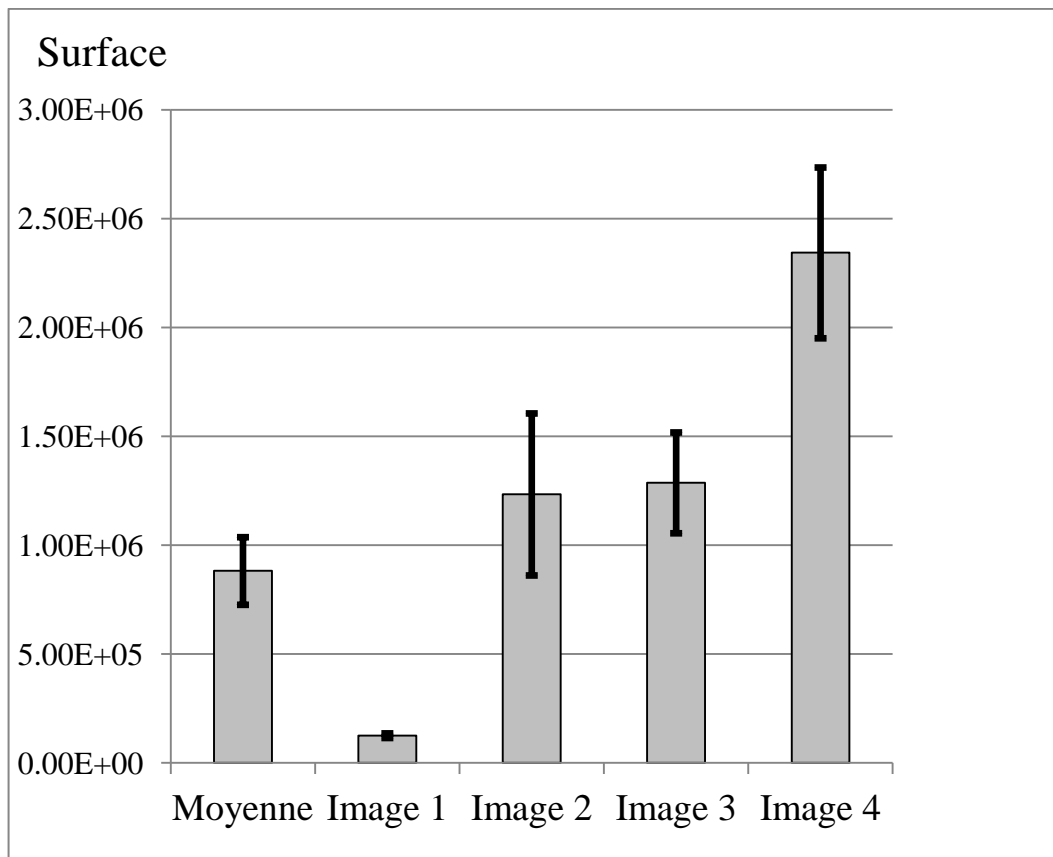


Figure 16: Estimation de la surface développée en nm² sur quatre photos (résultats globaux des cinq participants)

2.7.3. Evaluation de la variabilité pour le classement des particules et l'interprétation des analyses des spectres EDX

2.7.3.1. *Protocole*

- 1^{ère} étape : 30 micrographies de NP ont été sélectionnées dans une banque d'image constituée pendant les tests et la mise au point de la méthode d'analyse. Pour chaque particule, le panel devait classer les particules selon deux critères :

- l'aspect : particule individuelle, agrégat, fibre,
- la composition chimique présumée en fonction de l'aspect: métallique, minérale, carbonée, indéterminée.

- 2^{ème} étape : les spectres d'analyse en EDX de ces mêmes particules devaient être utilisés pour les classer en particules métalliques, minérales, carbonées, indéterminées.

2.7.3.2. Résultats

- 1^{ère} étape :

- le classement des particules en fonction de leur aspect ne pose pas de problème particulier avec un accord sur le classement dans 97% des cas,
- en revanche l'aspect de la particule ne permet pas de présumer de sa composition chimique avec un taux d'erreur de 54% par rapport à l'analyse EDX (min 30, max 80 %) et une variabilité inter opérateur importante illustrée par la Figure 17. Ce taux d'erreur moyen est plus faible (26,7%) pour les agrégats de carbone.

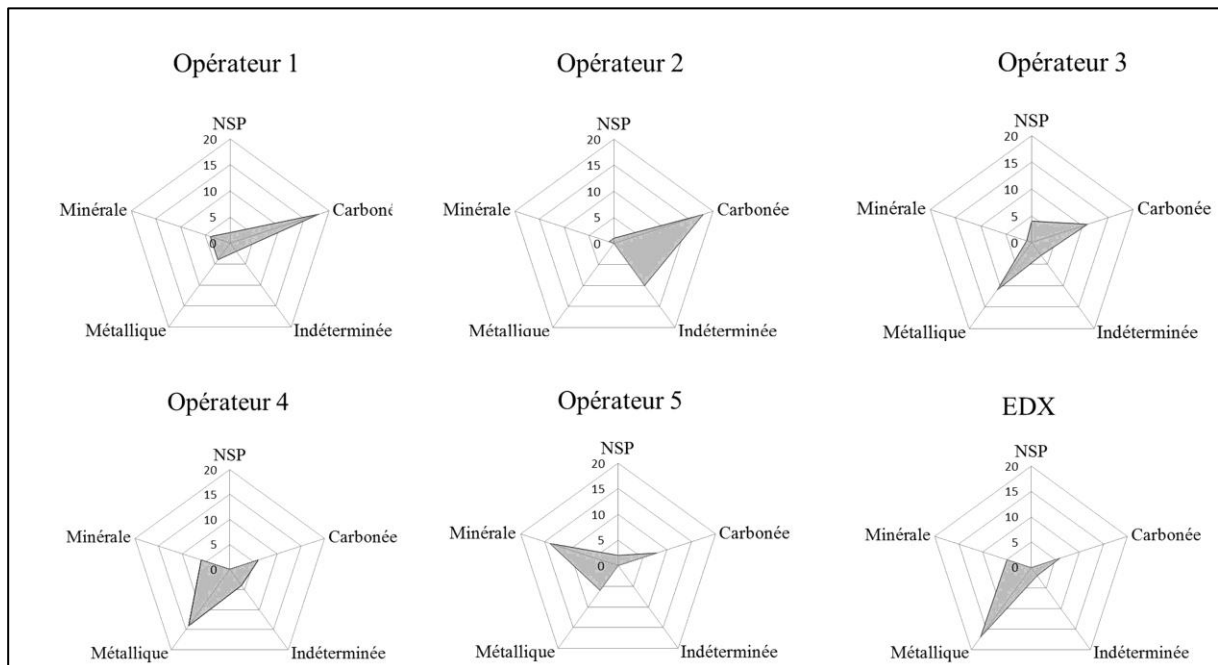


Figure 17 : Diagramme en radar des réponses du panel pour l'attribution d'une classe de composition chimique en fonction de l'aspect des NP.

- 2^{ème} étape : L'attribution d'une classe chimique est reproductible avec un accord dans 88% des cas comme le montre la Figure 18.

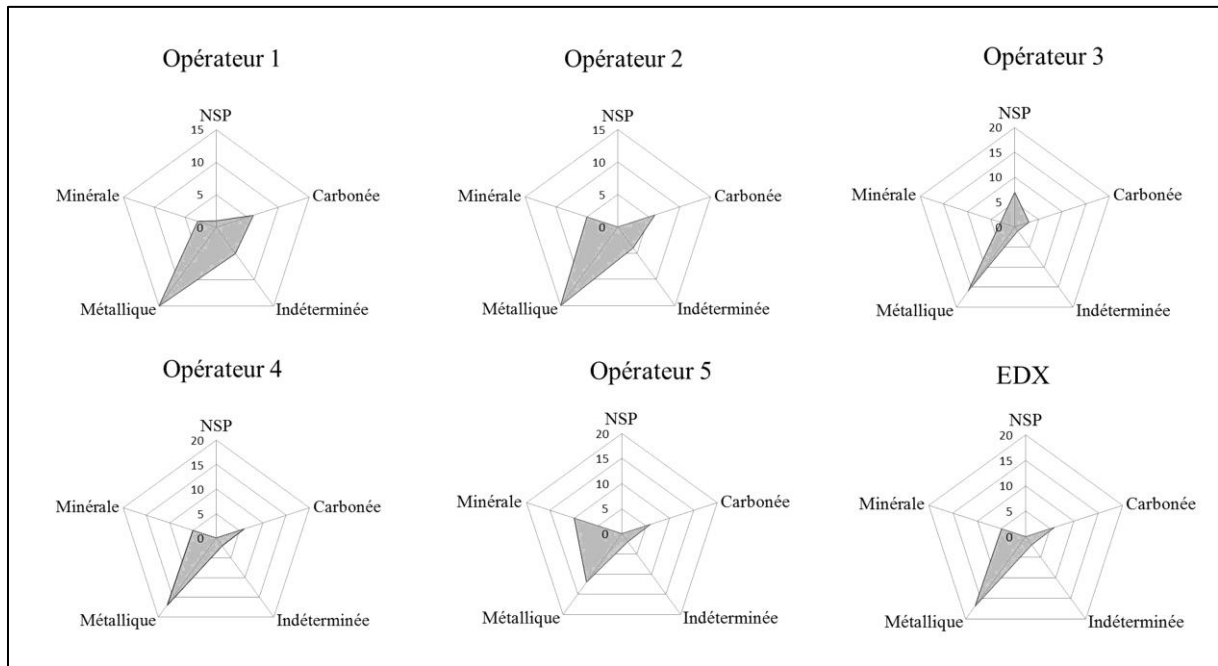


Figure 18 : Diagramme en radar des réponses du panel pour l'attribution d'une classe de composition chimique en fonction du spectre d'analyse EDX.

Compte tenu des résultats des tests d'inter-comparaison, et notamment du taux d'erreur important lors de l'attribution d'une classe de composition chimique en fonction de l'aspect, le groupe de travail a proposé de créer un atlas réunissant des photographies et des spectres EDX de particules types retrouvées dans le cadre de l'étude Nanotrans.

Un extrait de cet atlas est présenté en annexe 2.

Chapitre 2 :
Analyse des particules ultrafines dans les tissus humains : Etude
Nanotrans

1. Introduction - Objectifs

L'étude NANOTRANS est une étude cofinancée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), le conseil régional d'Aquitaine et le CHU de Bordeaux qui s'est déroulée de Mars 2010 à Juillet 2014. Les objectifs de cette étude étaient d'étudier la rétention pulmonaire des particules ultrafines et d'étudier leur translocation pleurale et systémique notamment placentaire.

Elle a associé 4 équipes: l'équipe Santé Travail Environnement du Centre INSERM U897, Bordeaux, le Laboratoire d'étude des particules inhalées de la ville de Paris, l'équipe 4 du centre INSERM, U955 et le laboratoire de minéralogie de l'hôpital Erasme, Bruxelles.

Cette étude a nécessité dans un premier temps, de mettre au point une méthode d'analyse des particules ultrafines dans les tissus humains reposant sur l'utilisation de la microscopie électronique à transmission et qui a fait l'objet de la première partie de ce manuscrit.

Dans cette deuxième partie est présentée l'application de ce protocole dans 2 études :

- une étude sur la rétention en PUF du tissu pulmonaire fœtal : l'étude Foetopuf,
- une étude de la rétention pulmonaire du parenchyme pulmonaire et de la plèvre adulte.

2. Etude Foetopuf : analyse de la rétention en PUF du tissu pulmonaire fœtal

2.1. Contexte

Les données de la littérature suggèrent qu'une exposition prénatale à la pollution particulaire peut être associée à des effets délétères sur le déroulement de la grossesse (hypotrophie, prématurité) ou chez la descendance notamment sur la morbi-mortalité respiratoire infantile (Backes et al. 2013; Stieb et al. 2012). Une exposition prénatale aux particules diesel (les PUF issues de la combustion les plus communes) pourrait être responsable d'effets sur la croissance, la maturation sexuelle et sur le comportement mais également avoir des effets génotoxiques, inflammatoires et favoriser la survenue d'allergies (Ema et al. 2013; Li et al. 2013).

Des effets similaires ont pu être décrits pour les nanoparticules manufacturées (Balansky et al. 2013; Blum et al. 2012; Campagnolo et al. 2013; Ghaderi et al. 2015; Hong et al. 2014; Jackson et al. 2012; Takahashi et al. 2010; Wu et al. 2015; Yoshida et al. 2010). Par exemple, des études ont démontré des effets génotoxiques hépatiques ou des effets sur le développement du système nerveux dans la descendance de souris gestantes exposées à des nanoparticules de carbone (Printex 90) (Jackson et al. 2012; Jackson et al. 2011). Ces effets peuvent également se révéler tardivement sur des organes aussi divers que l'appareil reproducteur, le système nerveux, immunitaire ou cardiovasculaire (Hougaard et al. 2011).

Certains effets reprotoxiques et notamment les effets sur le déroulement de la grossesse peuvent être expliqués par des mécanismes tels que la génération d'un stress oxydant, d'une inflammation, de troubles de la coagulation, de la fonction endothéliale ou des effets vasomoteurs qui peuvent induire une altération de la fonction placentaire notamment dans les échanges gazeux et de nutriments (Kannan et al. 2006). Cependant, les études *in vivo* portant sur la toxicocinétique des NP suggèrent que certains de ces effets pourraient être liés à une translocation transplacentaire (Ema et al. 2010; Hougaard et al. 2011).

Comme discuté précédemment, comparées aux particules de taille plus importante, en raison notamment de leur taille, les NP peuvent avoir une demi-vie sanguine plus longue et des propriétés de translocation à travers les barrières biologiques induisant une biodisponibilité plus importante pour les organes périphériques (Almeida et al. 2011; Landsiedel et al. 2012). Ces propriétés qui peuvent être intéressantes dans le cadre du développement des nanomédicaments (Menezes, Malek, and Keelan 2011), engendrent également des inquiétudes sur

leur toxicité potentielle notamment chez la femme enceinte (Pietrojusti, Campagnolo, and Fadeel 2013).

2.2. Objectifs

L'objectif principal de l'étude Foetopuf était d'évaluer l'hypothèse d'une translocation placentaire de particules fines ou ultrafines inhalées par la mère, en recherchant ces particules dans des échantillons de tissu pulmonaire fœtal prélevés dans le cadre d'interruptions médicales de grossesse.

L'objectif secondaire était d'évaluer la corrélation entre la présence de ces particules dans les tissus fœtaux et les données d'expositions environnementales et professionnelles maternelles évaluées par un questionnaire.

2.3. Matériel et méthodes

L'étude Foetopuf est une étude observationnelle mono centrique qui s'est déroulée d'Aout 2009 à Aout 2013 au CHU de Bordeaux dont le protocole a été validé par le comité de protection des personnes Sud-ouest et Outre mer III.

2.3.1. Inclusion des patientes

2.3.1.1. Critères d'inclusion

Pouvaient être incluses dans l'étude, toutes les femmes majeures de nationalité française qui acceptaient de participer à l'étude après information sur les modalités de l'étude et pour lesquelles une autopsie fœtale était proposée suite à une interruption médicale de grossesse (IMG) après 20 semaines d'aménorrhée.

2.3.1.2. Modalités de recrutement et visite d'inclusion

En cas d'anomalies graves d'origine maternelle ou fœtale dans le déroulement d'une grossesse, une décision de proposer une IMG peut être prise après avis d'un comité pluridisciplinaire.

Le recrutement a été réalisé par le biais de la consultation de génétique médicale au cours de laquelle la patiente est informée des conclusions du comité pluridisciplinaire.

Lors de cette consultation, le médecin informe la patiente du déroulement de l'étude Foetopuf, lui remet la note d'information, répond à toutes ses questions concernant les objectifs, la nature des contraintes, les risques prévisibles, les bénéfices attendus et les modalités d'opposition à l'étude.

Il recueille également les informations sur les expositions environnementales et professionnelles de la mère.

A l'issue de cette consultation, l'accord des parents pour pratiquer une IMG est recueilli. Lors d'une seconde consultation, un gynécologue obstétricien explique à la patiente les modalités techniques et médicales de l'IMG et la possibilité de réaliser, avec son accord et celui du père, une autopsie afin de préciser les pathologies présentées par le fœtus et le placenta.

Dans le cas où les parents souhaitent l'autopsie, ils sont invités à signer un consentement pour l'autopsie du fœtus conformément aux pratiques habituelles de l'unité de pathologie fœto-placentaire du service d'anatomo-pathologie du CHU de Bordeaux. Un classeur a été placé en salle d'accouchement afin d'enregistrer et de tracer les oppositions exprimées oralement aux obstétriciens ou aux sages-femmes

2.3.1.3. Recueil et conservation des échantillons

Après l'IMG, le placenta et le fœtus sont transmis à l'unité de pathologie fœto-placentaire du service d'anatomo-pathologie du CHU de Bordeaux.

Une autopsie fœtale est réalisée par un médecin de l'unité de pathologie fœto-placentaire du service d'anatomo-pathologie du CHU de Bordeaux. Cette autopsie comprend systématiquement un examen macroscopique et anatomopathologique du placenta et des tissus fœtaux.

Lors de cette autopsie un échantillon de tissu pulmonaire est prélevé et est conservé par congélation à -80°C au sein de l'unité.

2.3.1.4. Inclusion définitive

Une inclusion est définitive après confirmation et vérification du prélèvement, vérification du recueil correct des données d'exposition de la mère et vérification de l'absence de critère d'exclusion sur le compte rendu d'autopsie.

2.3.2. Analyse des échantillons en microscopie électronique

Les échantillons ont été préparés par un protocole de digestion/microfiltration et analysés en MET selon le protocole Nanotrans n°2 présenté précédemment avec un microscope JEOL 2010, LaB6 équipé d'un spectromètre X à dispersion d'énergie (IDFix 12.2.1, SAM'X).

2.3.3. Evaluation des expositions maternelles aux particules ultrafines

2.3.3.1. *Tabagisme*

Les patientes ont été classées selon 3 modalités en fonction de leur consommation tabagique :

- non fumeuse,
- fumeuse passive,
- ex-fumeuse,
- fumeuse.

2.3.3.2. *Expositions professionnelles*

L'exposition professionnelle aux particules nanométriques manufacturées et non intentionnelles a été évaluée par une expertise en aveugle des données médicales et de l'analyse en MET. Elle a été réalisée par une hygiéniste industrielle travaillant à l'élaboration d'une matrice emploi-exposition spécifique aux particules ultrafines.

L'évaluation de l'exposition repose sur l'estimation de la probabilité d'exposition de la mère dans son emploi, défini par une profession et un secteur d'activité. La probabilité d'une exposition supérieure à la population générale est estimée selon 4 classes :

- 0 : aucune exposition supérieure à la population générale retrouvée,
- 1 : possible (probabilité d'exposition <10%),
- 2 : probable (probabilité d'exposition entre 10 et 50%),
- 3 : très probable (probabilité d'exposition >50%).

Lorsqu'une exposition est suspectée, les familles chimiques prépondérantes qui sont potentiellement émises dans ce type d'emploi sont indiquées parmi 4 familles possibles :

- particules métalliques et oxydes métalliques,
- particules minérales,
- particules carbonées,

- particules organiques (exemple : bois, poussières végétales...).

2.3.3.3. *Expositions environnementales*

L'adresse du domicile de chaque patiente a été géocodée. Ce géocodage a permis, à partir des données sur les émissions en particules ultrafines en Aquitaine transmise par AIRAQ (association agréée par le ministère en charge de l'écologie pour la surveillance de la qualité de l'air en Aquitaine) (AIRAQ 2010; Pradeau et al. 2015), de classer les patientes en :

- exposition forte : domicile classé en zone urbaine par l'INSEE (Institut national de la statistique et des études économiques),
- exposition faible : domicile classé en zone rurale par l'INSEE.

Le géocodage a également permis de calculer la somme ($\sum_{CLC11+CLC12}$) des pourcentages d'occupation des sols en zones urbanisées (CLC11) et des zones industrielles ou commerciales et des réseaux de communication (CLC12) dans un rayon de 1 km autour de l'adresse. Pour les adresses hors Aquitaine ne faisant pas partie du périmètre de compétence d'AIRAQ, cette somme a été obtenue pour la commune entière.

2.3.4. Analyses statistiques

Une corrélation entre la rétention particulaire et l'âge gestationnel a été recherchée en calculant le coefficient de corrélation gamma (Bodenhofer and Klawonn 2008) entre ces deux variables.

Compte tenu de l'absence d'exposition professionnelle notable retrouvée, cette information n'a pas été traitée dans l'analyse statistique.

La comparaison des moyennes de concentration en particules des échantillons fœtaux (concentration totale et détaillée par classe chimique) en fonction de l'exposition maternelle a reposé sur le test de Mann-Whitney avec un risque $\alpha=0,05$ quand deux groupes ont été comparés et sur le test de Kruskal-Wallis avec un risque $\alpha=0,05$ quand plus de deux groupes étaient comparés.

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel R.2.15.3 et pour le calcul du coefficient de corrélation gamma, avec le package RoCoCo (Bodenhofer and Krone 2013) disponible sur le lien suivant : <http://cran.rproject.org/web/packages/rococo/vignettes/rococo.pdf>).

2.4. Résultats

Les résultats sont exprimés en concentration numérique ou surface développée rapportées au poids sec de tissu pulmonaire (n/g ou nm²/g).

2.4.1. Données médicales et données d'exposition

2.4.1.1. *Données maternelles*

30 patientes ont été incluses. Les données médicales et d'exposition sont résumées dans le Tableau 16.

Données générales	Moyenne	σ
Age maternel (années)	26,4	7,2
Age gestationnel (semaines)	27,4	3,9
Poids fœtal (g)	1100,6	696,3
Données d'exposition	N	%
<u>Exposition professionnelle</u>		
Sans emploi	10	33,3
Absence d'exposition	16	53,3
Exposition possible	4	13,3
<u>Exposition environnementale</u>		
Faible	11	36,7
Forte	19	63,3
<u>Exposition à la fumée de tabac</u>		
Aucune	15	50
Fumeuse passive	3	10
Ex-fumeuse	7	23,3
Fumeuse active	5	16,7

Tableau 16: Synthèse des données médicales et d'exposition

L'âge moyen des patientes était de 26,4 ans (écart-type : 5,2 ans).

Nous n'avons pas retrouvé d'exposition professionnelle certaine aux PUF chez les patientes incluses. Un tiers des patientes est sans activité professionnelle (10 ; 33,3%). Parmi les autres patientes, une exposition est estimée possible pour seulement quatre patientes (13.3%) :

- exposition possible aux particules minérales chez une architecte lors des activités de visites de chantier,
- exposition possible aux particules carbonées, et minérales chez une ouvrière viticole (exposition aux gaz d'échappement et poussières agricoles),
- exposition possible aux particules carbonées chez une infirmière (activités de bloc opératoire pouvant exposer aux fumées de bistouri électrique),
- exposition possible aux particules métalliques chez une femme de ménage (pouvant être contenues dans les aérosols des produits ménagers).

La moitié des patientes n'ont pas d'exposition à la fumée de tabac. Trois (10%) sont exposées au tabagisme passif, sept (23,3%) sont ex-fumeuses, cinq (16,7%) sont fumeuses. Toutes les patientes ex-fumeuses ont arrêté lors de la découverte de leur grossesse.

La majorité des patientes (63,3%) habitait en zone urbaine et était donc considérée comme ayant une exposition environnementale forte. La répartition des patientes en fonction de leur exposition environnementale est représentée dans la Figure 19. Le pourcentage de zones urbanisées, de zones industrielles et de réseaux de communication autour du domicile était inférieur ou égal à 15% pour tous les domiciles considérés comme ruraux et supérieur ou égal à 40% pour tous les domiciles considérés comme urbains.

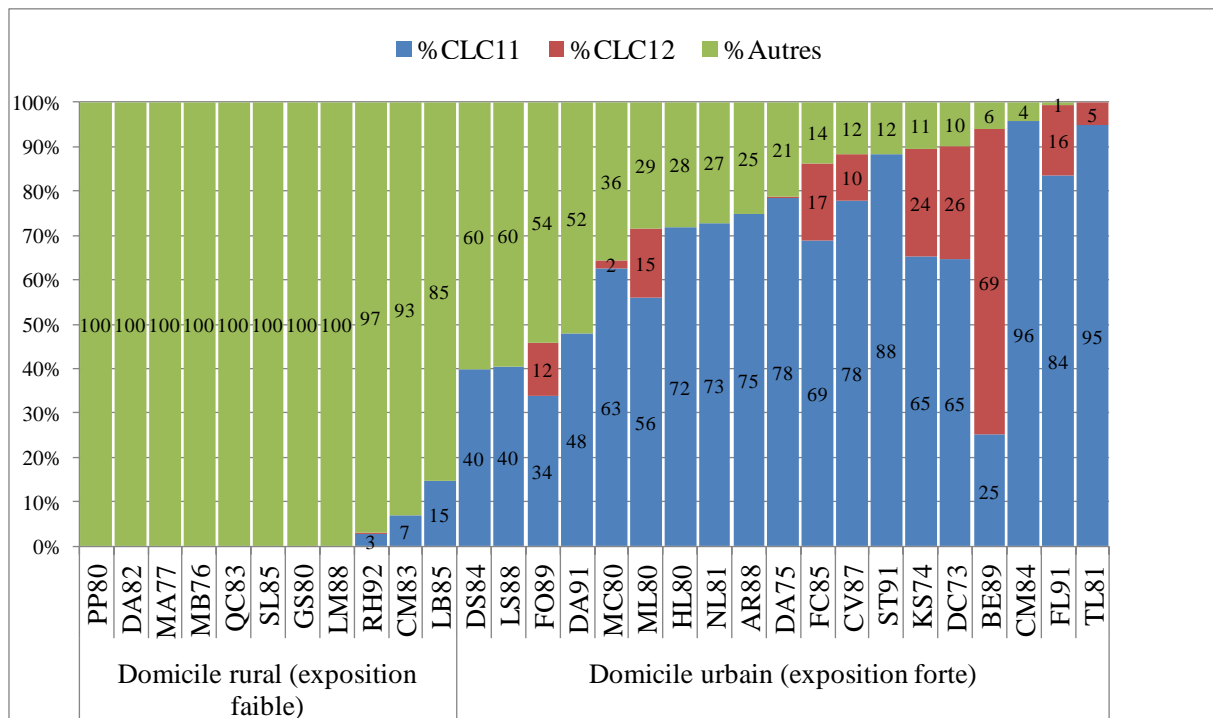


Figure 19: Répartition (en %) de l'occupation des sols (CLC11 : zones urbaines /CLC12 zones industrielles et réseaux de communication/autres) autour du domicile des patientes incluses dans l'étude.

2.4.1.2. *Données fœtales*

L'âge gestationnel lors de l'IMG est compris entre 22 et 37 semaines d'aménorrhées (âge moyen 27,4 semaines d'aménorrhée, écart-type 3,9 semaines d'aménorrhée) pour un poids fœtal moyen de 1100,6 g (écart-type : 696,3 g).

Onze fœtus (36,7%) présentaient une anomalie cardiaque (quatre présentaient une communication inter ventriculaire et sept présentaient une cardiopathie complexe) et quinze présentaient un placenta anormal (treize présentaient un placenta immature et deux présentaient une artère ombilicale unique).

2.4.2. Résultats des analyses en MET

Une rétention significative de particule est retrouvée dans 23 échantillons pulmonaires parmi les 30 analysés (76,7%). Dans ces échantillons, la concentration en particules est comprise entre 2,8 et 43,8 x10⁶/g (moyenne 12,7 x10⁶/g, écart-type : 11,6 x10⁶/g) ce qui représente une surface développée comprise respectivement entre 0,01 mm²/g et 6,7 mm²/g (moyenne 1,3 mm²/g, écart-type 1,9 mm²/g).

La distribution des échantillons classés par concentration numérique croissante est présentée dans la Figure 20.

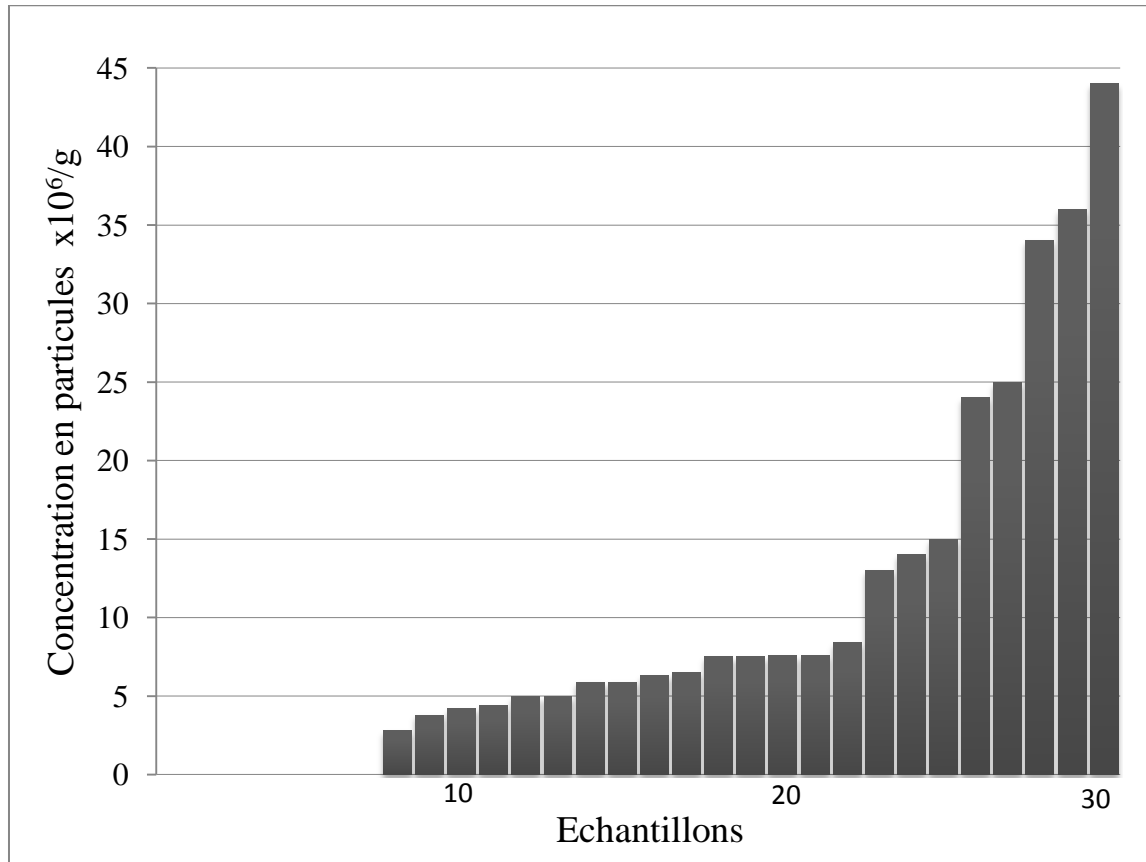


Figure 20: Répartition des échantillons en fonction de leur concentration numérique en particules.

La majorité des particules retrouvées sont des agrégats de NP qui représentent 73,4% des particules et 94% de la surface développée avec des diamètres qui vont de 64 à 2533 nm (moyenne : 472 nm, écart-type: 453 nm). Ces agrégats sont composés de particules individuelles dont la taille dépend de la composition chimique (environ 50 nm pour les particules carbonées, entre 10 et 300 nm pour les particules métalliques). Les autres particules étaient des particules individuelles. Nous n'avons pas retrouvé de fibres. La composition chimique des particules retrouvées dans les différents échantillons est résumée dans le Tableau 17 et la Figure 21.

Les particules carbonées représentent 12,2 % des particules détectées et 3,9% de la surface développée, elles sont retrouvées dans seulement cinq échantillons.

Les particules minérales constituées de silice ou de silicates représentent 15,2% des particules détectées et 12,2% de la surface développée et ont été retrouvées dans trois échantillons.

La plupart des particules détectées (72,6%) sont donc des particules métalliques qui représentent 83,5% de la surface développée et sont retrouvés dans quasiment tous les échantillons présentant une rétention significative (22 sur 23). Ces particules métalliques sont essentiellement constituées par ordre de fréquence de fer (34,3%), de titane (10,8%), d'alliage de métaux composés (Fe,Cr,Ni) 9,6%, et d'aluminium (7,7%). Les autres particules métalliques (3,8%) sont par exemple des particules de cérium retrouvées dans deux échantillons ou des particules d'étain et de gadolinium retrouvées dans un échantillon. Les particules individuelles avaient un diamètre compris entre 54 et 489 nm (moyenne : 228 nm ; écart-type : 115 nm).

	Concentration (x10 ⁶ part./g)					Surface (mm ² /g)			
	N*	Moy	σ**	Min	Max	Moy	σ	Min	Max
Total	23	12,7	11,6	2,8	43,8	1,29	1,94	0,01	6,68
Carbonées	5	7,2	5,7	3,2	16,8	0,23	0,29	0,03	0,71
Minérales									
Total	3	14,9	8,7	8,4	24,7	1,24	1,78	0,12	3,29
Si	3	12,3	11,0	3,8	24,7	1,14	1,86	0,02	3,29
Métalliques									
Total	22	9,7	8,0	2,8	35,6	1,12	1,83	0,01	6,60
Fe	12	8,4	6,6	3,8	27,3	1,70	2,39	0,02	6,60
Ti	6	5,3	2,3	3,3	9,7	0,30	0,48	0,05	1,28
Fe Cr Ni	6	4,7	1,9	2,8	8,2	0,40	0,37	0,05	1,05
Al	3	7,5	6,0	3,8	14,4	0,58	0,85	0,02	1,55
Autres	7	4,1	0,5	3,2	4,6	0,14	0,16	0,01	0,46

*N: nombre d'échantillon contenant des particules de la composition chimique mentionnée,

**σ: Ecart type,

Tableau 17 : Synthèse de la composition chimique des particules retrouvées dans les échantillons pulmonaires fœtaux.

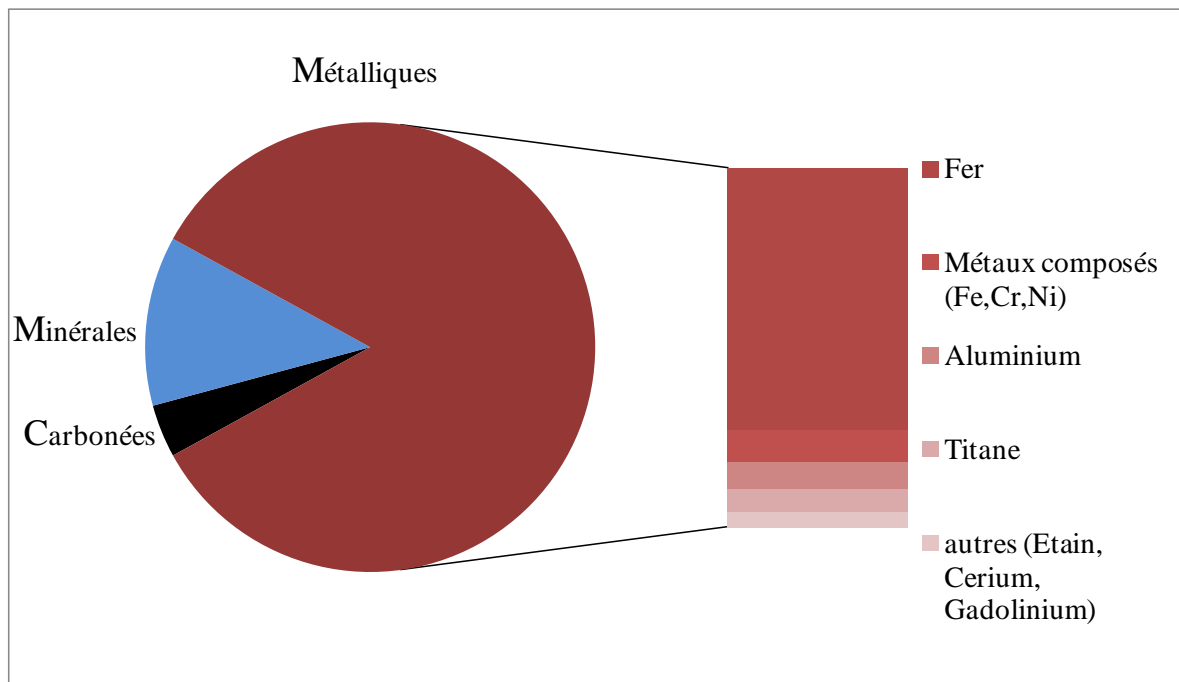


Figure 21: Synthèse de la composition chimique des particules retrouvées dans les échantillons pulmonaires fœtaux

Trois exemples de micrographies des particules retrouvées dans les échantillons et de leur spectre EDX sont présentés dans la Figure 22.

En dehors des pics liés aux éléments présents dans les particules, les spectres en EDX sont caractérisés par la présence de deux pics :

- un pic de carbone lié à la présence de la couche de carbone déposée par évaporation,
- un pic de cuivre lié à l'utilisation de grille de cuivre.

Les agrégats carbonés ont un aspect caractéristique en MET. Le spectre EDX des particules carbonée se caractérise par une majoration du pic de carbone. Les NP métalliques apparaissent plus denses sur les micrographies.

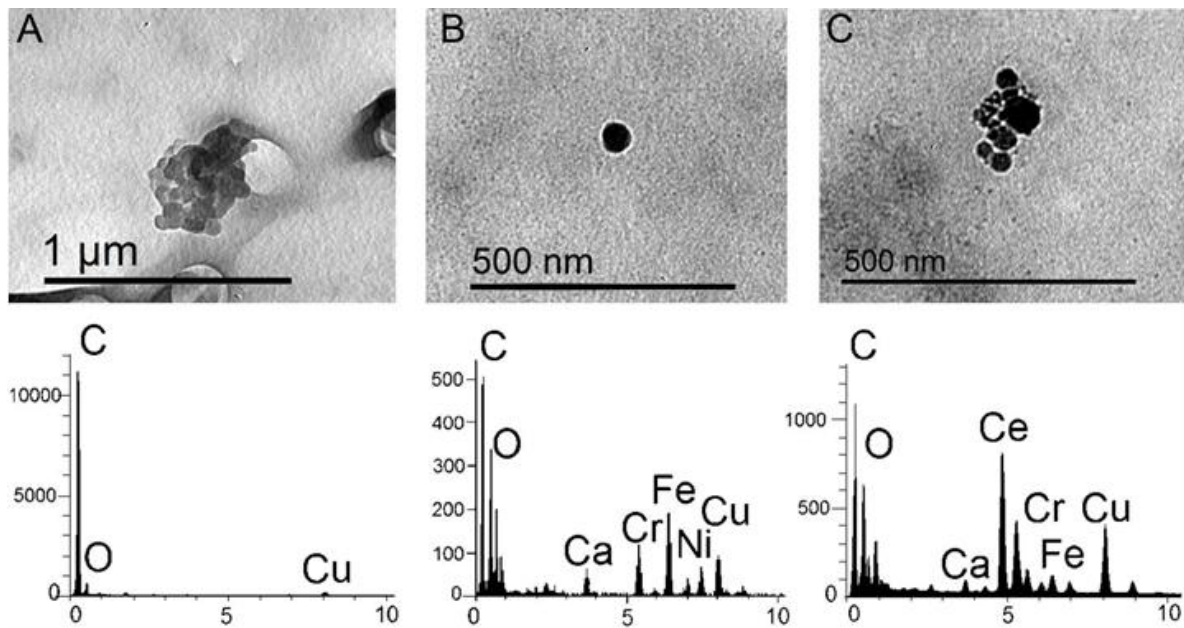


Figure 22: Micrographie et spectre EDX : A) d'un agrégat carboné (x 30000), B) d'une particule isolée d'alliage Fe, Cr, Ni (acier inox) (x 60000), C) d'un agrégat de cérium (x80000).

Les NP de fer retrouvées dans les échantillons peuvent être d'origine exogène mais également résulter de la complexation du fer endogène (ferritine) (Powell et al. 2010). Ces particules de fer endogène sont particulièrement fréquentes dans les poumons présentant des processus congestifs. Deux exemples de particules de fer endogène et exogène sont présentés dans la Figure 23. Comme il n'était pas toujours possible de différencier ces particules en MET, les analyses statistiques ont été réalisées sur les particules métalliques totales et également sur les particules non ferriques afin de ne considérer que les particules exogènes.

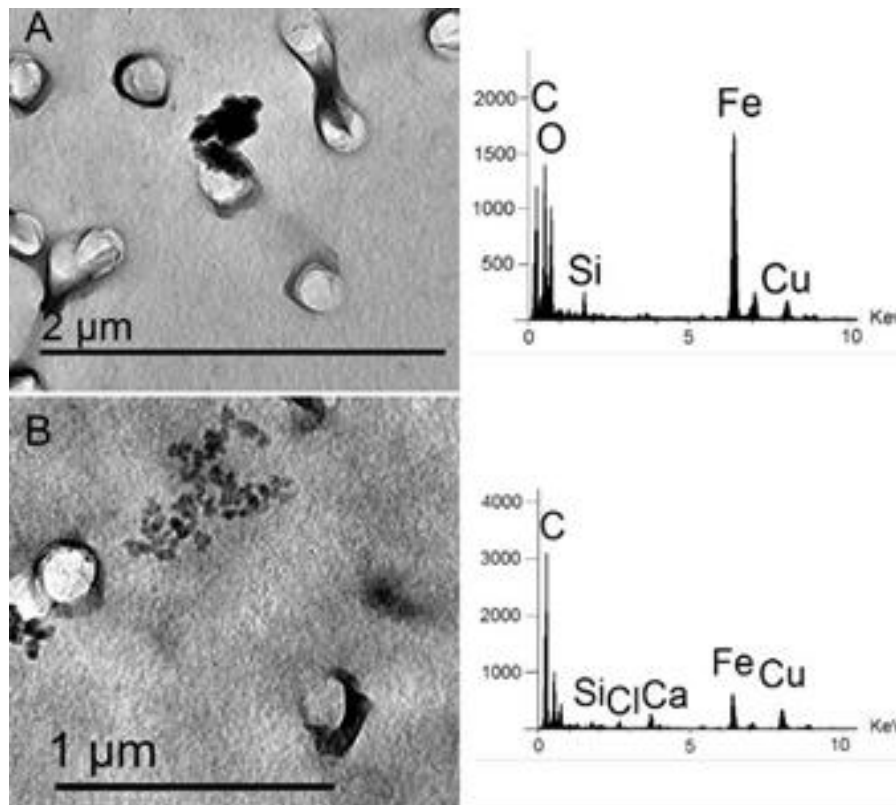


Figure 23: Micrographies de nanoparticules de fer exogène (A) and endogène (B) et spectres EDX associés.

2.4.3. Recherche d'une corrélation entre rétention en particules, données médicales et données d'exposition maternelles

Il n'y avait pas de différence significative entre la moyenne des concentrations en particules des échantillons provenant des fœtus présentant une anomalie cardiaque et celles des autres échantillons. Il n'y avait pas non plus de différence entre les fœtus présentant une anomalie du placenta et les autres. Les coefficients de corrélation Gamma entre l'âge maternel, l'âge gestationnel, l'exposition environnementale (représentée par la somme des pourcentages de zones urbanisées, industriels et les réseaux dans un périmètre de 1 km autour du domicile) et les concentrations en particules sont présentés dans le Tableau 18. Tous les coefficients tendent vers 0, indiquant l'absence de corrélation entre ces variables et les concentrations numériques en particules. Il n'y a pas non plus de corrélation entre ces indicateurs et les concentrations exprimées en surface développée par les particules (Tableau 19).

	Concentration numérique			
	Toutes particules	Particules carbonée	Particules métalliques	Particules métalliques non ferriques
Age maternel	-0.04	0.03	-0.06	-0.07
Age gestationnel	-0.05	0.11	-0.13	-0.14
$\Sigma_{CLC11+CLC12}$	0.07	-0.06	0.10	0.12

Tableau 18 : Coefficients de corrélation gamma entre les concentrations numériques en particules des échantillons fœtaux et les données médicales ou d'exposition maternelle.

	Surface développée			
	Toutes particules	Particules carbonée	Particules métalliques	Particules métalliques non ferriques
Age maternel	0.08	0.02	0.12	-0.06
Age gestationnel	0.06	0.12	0.04	-0.05
$\Sigma_{CLC11+12}$	0.10	-0.07	0.15	0.14

Tableau 19: Coefficients de corrélation gamma entre les surfaces développées de particules des échantillons fœtaux et les données médicales ou d'exposition maternelle.

Aucune particule carbonée n'a été retrouvée dans les échantillons pulmonaires provenant de fœtus de patientes non fumeuses. Il existe donc une différence significative de rétention en particule carbonées avec les échantillons provenant du groupe des mères exposées à la fumée de tabac ($p = 0,018$) parmi lesquelles 4 échantillons comportaient des PUF de carbone. Cette différence significative était également retrouvée lorsque la rétention était exprimée en surface développée. On observe également une concentration moyenne toutes particules confondues et en particules métalliques qui a tendance à être plus importante dans le groupe des patientes exposées au tabac cependant il n'y a pas de différence statistiquement significative.

Exposition à la fumée de tabac	Concentration en particules ($\times 10^6/g$) : moyenne (σ)		p-value
	Non-exposées	Exposée	
Total	8,7 (11,4)	10,8 (11,9)	0,60
Particules carbonée	0 (0)	2,4 (4,6)	0,02*
Particules métalliques	6,3 (8,8)	7,9 (7,5)	0,66

Tableau 20 : Comparaison de la concentration moyenne en particules dans les échantillons fœtaux en fonction du statut tabagique maternel. (* représente les résultats significatifs)

Les résultats suggèrent également un impact de l'exposition environnementale. Les concentrations moyennes de toutes les particules sont plus élevées dans les échantillons provenant de mères dont l'exposition est considérée comme forte (lieu de résidence en zone urbaine) (Tableau 21). Ces différences ne sont cependant pas significatives mais persistent lorsqu'une stratification selon l'exposition maternelle à la fumée de tabac est réalisée. Les résultats sont identiques lorsque la surface développée en particules est considérée.

	Concentration en particules $\times 10^6/g$		P-value
	(SD)		
	Exposition environnementale faible	Exposition environnementale forte	
Toutes particules	5,0 (4,0)	12,5 (13,5)	0,22
Particules carbonées	0,6 (1,4)	1,5 (4,2)	1
Particules métalliques	4,4 (4,1)	8,7 (9,4)	0,34

SD: écart-type

Tableau 21 : Comparaison des concentrations en particules en fonction de l'exposition environnementale maternelle.

Concentration en particules ×10 ⁶ /g (SD)	Non exposées au tabac			Exposées au tabac*		
	Exposition Environ. faible	Exposition Environ. forte	P- value	Exposition Environ. faible	Exposition Environ. forte	P- value
Toutes particules	4,1 (3,9)	11,0 (13,3)	0,493	5,7 (4,3)	14,21 (14,3)	0,29
Particules de carbone	0 (0)	0 (0)	-	1,2 (1,8)	3,20 (5,8)	0,73
Particules métalliques	4,1 (3,9)	7,4 (10,5)	0,755	4,6 (4,7)	10,1 (8,5)	0,26

*fumeuses, ex-fumeuses, fumeuses passives

Tableau 22 : Comparaison des concentrations en particules en fonction de l'exposition environnementale maternelle et de l'exposition maternelle à la fumée de tabac (écart-type).

2.5. Discussion

Les études suggèrent que les expositions intra-utérines à certaines substances chimiques pourraient être responsables de cancers ou d'autres maladies durant l'enfance ou à l'âge adulte (Barton et al. 2005). Certains des effets prénataux des particules ultrafines observés dans les études expérimentales peuvent être expliqués par leur dissolution et la diffusion à travers les barrières biologiques d'espèces chimiques dissoutes potentiellement toxiques (Wu et al. 2015). Cependant, les effets toxiques peuvent également être liés à la fraction insoluble de ces particules qui en cas de translocation exposent les structures cellulaires à de fortes concentrations localisées (Schmid et al. 2009).

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'un transfert transplacentaire des particules fines et ultrafines est possible et par conséquent qu'une exposition fœtale à des substances exogènes potentiellement toxiques sous forme particulaire est possible.

Ces résultats concordent avec les données actuelles de la littérature sur la translocation placentaire des particules. Les études expérimentales réalisées sur des modèles murins suggèrent que quasiment tous les types de NP testés sont capables de traverser la barrière placentaire (Buerki-Thurnherr, von Mandach, and Wick 2012; Chu et al. 2010; Melnik et al. 2013), avec de possibles effets fœtaux tels qu'une inflammation (Tian et al. 2013), des effets immunitaires (El-Sayed et al. 2015), génotoxiques (Balansky et al. 2013), une hypotrophie

(Yamashita et al. 2011), des troubles reproductifs (Jo et al. 2013; Kong et al. 2014; Takeda et al. 2009; Yoshida et al. 2010) ou des effets sur le système nerveux (Cui et al. 2014; Ghaderi et al. 2015; Mohammadipour et al. 2014; Takeda et al. 2009; Umezawa et al. 2012), notamment en cas d'expositions répétées (Di Bona et al. 2014).

Le transfert transplacentaire est taille-dépendant (Semmler-Behnke et al. 2014) sans qu'il y ait un seuil clairement défini. Il existe des canaux placentaires d'un diamètre d'environ 15-25 nm suffisant pour laisser passer des particules de diamètre inférieur tels que des quantum dots (Chu et al. 2010) ou des NP d'or (Semmler-Behnke et al. 2014). Il a également été démontré que des particules plus grosses, de plus de 500 nm étaient également capables de traverser le placenta (Buerki-Thurnherr, von Mandach, and Wick 2012; Refuerzo et al. 2011). Pour ces particules, une endocytose clathrine-dépendante ou via les cavéoles pourraient expliquer ce passage (Rattanapinyopituk et al. 2014).

Bien que cela ne se vérifie pas dans nos données, la perméabilité du placenta dépend également de l'âge gestationnel (Juch et al. 2013; Yang et al. 2012). En effet, la barrière placentaire est plus fine et probablement plus perméable aux particules durant les trois derniers mois de grossesse (Pietrojusti, Campagnolo, and Fadeel 2013). Dans la mesure où la moitié des placentas dans notre étude étaient immatures, il est possible que nous ayons sous-estimé l'exposition fœtale.

A ce jour, il y a très peu de données sur la translocation placentaire de particules chez l'homme. Les études expérimentales de perfusion placentaire ex-vivo suggèrent que des particules de silice d'une taille comprise entre 25 et 50 nm (Sonnegaard Poulsen et al. 2013) ou des particules de polystyrène fluorescentes de plus de 240 nm (Wick et al. 2010) sont capables de traverser le placenta et même de façon bidirectionnelle (Grafmüller et al. 2015). D'autres auteurs n'ont pas retrouvé de passage de NP d'or (Myllynen et al. 2008).

Les données sur la présence de particules dans des échantillons fœtaux humains sont rares. Haque *et al* (Haque, Vrazel, and Uchida 1998) ont retrouvé des particules d'amiante (longueur moyenne de 1,55µm) dans la moitié des 82 échantillons de poumon, muscle, foie qu'ils ont analysés et provenant d'enfant mort-nés. Une association significative entre la présence de ces fibres et les antécédents maternels de fausses couches spontanées et de pathologies placentaires était retrouvée. Il n'y a pas à notre connaissance d'autres données quantitatives dans la littérature. Dans une étude observationnelle sur 18 fœtus, basée sur des analyses en microscopie électronique à balayage (MEB), Gatti *et al* ont retrouvé des NP

métalliques essentiellement sous la forme d'agrégats (taille moyenne entre 3,9 et 7,5 μm) dans des échantillons hépatiques et rénaux. La présence de ces particules n'était pas corrélée aux concentrations maternelles sériques en métaux mais l'était en revanche avec des anomalies de fermeture du tube neural (Gatti et al. 2011). L'une des limites de cette étude est que la méthode d'analyse en MEB ne permettait pas de quantifier les particules.

Notre étude est la première à proposer des données quantitatives sur la rétention de NP dans des tissus fœtaux. Ces données quantitatives nous ont permis de retrouver une corrélation entre l'exposition maternelle à la fumée de tabac et la présence de NP carbonées dans les échantillons fœtaux. Nous avons également retrouvé une tendance non statistiquement significative évoquant une corrélation entre les concentrations en particules et l'exposition à la pollution environnementale qui persistait après stratification sur l'exposition maternelle au tabac. L'absence de significativité de ces résultats peut être expliquée par la petite taille de notre échantillon liée aux difficultés de recrutement dans ce type d'étude. Elle peut également être expliquée par un biais de classement lors de l'évaluation de l'exposition maternelle aux particules en ne considérant que les particules inhalées. En effet, bien que la voie respiratoire soit la plus documentée dans la littérature et probablement la voie majeure (Schmid et al. 2009), une exposition maternelle à des particules provenant de l'alimentation est également possible (Frohlich and Roblegg 2012; Powell et al. 2010) et devra être mieux prise en compte dans des études futures.

Le choix d'analyser des échantillons pulmonaires fœtaux peut être critiqué. En effet, comme discuté dans la première partie de ce manuscrit, les données récentes de la littérature montrent que les NP administrées par voie parentérale dans les études expérimentales se concentrent préférentiellement dans les tissus riches en cellules du système monocyte-macrophage comme le foie, la rate et les ganglions lymphatiques (Rinaldo et al. 2015). Des études récentes indiquent que les mêmes organes seraient impliqués dans les expositions intra-utérines (Tsyganova et al. 2014) même si des particules peuvent également être retrouvées dans les échantillons pulmonaires (Lee et al. 2012; Qi et al. 2014). Ces données étaient encore rares lors de la mise en place de notre étude. Le choix du type d'échantillon a été guidé par les travaux de Haque *et al* (Haque, Vrazel, and Uchida 1998) qui avaient retrouvé que les échantillons dans lesquels les particules d'amiantes étaient le plus souvent retrouvées étaient des échantillons pulmonaires. Ce choix a été également fait en raison des difficultés méthodologiques pour la préparation d'échantillons très vascularisés tels que le foie ou la rate.

2.6. Conclusion

Cette étude démontre que des particules exogènes présentes dans la circulation sanguine maternelle sont capables de traverser le placenta et de s'accumuler dans les tissus fœtaux où elles peuvent être quantifiées et caractérisées. Nos données suggèrent qu'il est également possible de corrélérer les concentrations en NP dans des tissus fœtaux et les données d'exposition maternelle. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ne permettent cependant pas de conclure si la présence de ces particules dans les échantillons fœtaux représente un risque pour la santé. Dans la mesure où les expositions humaines aux NP commerciales notamment médicales sont probablement amenées à se majorer dans le futur, des études afin de mieux évaluer le risque reprotoxique lié aux NP sont souhaitables.

3. Etude de la rétention pulmonaire et pleurale en particules fines et ultrafines

Les données actuelles sur la toxicocinétique des particules ultrafines inhalées présentées dans la première partie de ce manuscrit indiquent que les particules retrouvées dans la plèvre pariétale peuvent avoir deux origines :

- une translocation systémique des NP transportées par les artères intercostales et diaphragmatiques,
- le drainage lymphatique du liquide pleural par les stomates de la plèvre pariétale pendant l'inspiration. Ce liquide pleural peut contenir des NP qui sont passées dans l'espace pleural depuis les alvéoles pulmonaires (Bernaudin and Fleury-Feith 2006).

Il a été démontré que des particules peuvent se concentrer au niveau de la plèvre pariétale comme des particules de carbone dans les poumons de mineur de charbon (Boutin et al. 1996), ou des fibres d'amiante (Sebastien et al. 1980). Ces particules s'accumulent et forment des lésions macroscopiques appelées black spots (Boutin et al. 1996; Donaldson et al. 2010), plus fréquemment localisées au niveau des zones para vertébrales et axillaires des bases pulmonaires et du diaphragme (Mitchev, Dumortier, and De Vuyst 2002). Il existe très peu de données sur la translocation des autres particules et notamment des particules ultrafines dans la plèvre humaine et leur présence dans les black spots.

L'objectif de cette étude était de documenter cette translocation en utilisant l'analyse en microscopie électronique à transmission d'échantillons de parenchyme pulmonaire, de plèvre saine et de plèvre anthracosique (contenant des black spots) provenant de 10 patients.

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. La population

Les sujets ont été sélectionnés à partir d'une étude précédente dans laquelle la distribution, l'aspect macroscopique des black spots et leur corrélation avec la présence de plaques pleurales ont été étudiés chez 150 sujets citadins autopsiés dans le département d'anatomopathologie de l'hôpital Érasme à Bruxelles (Mitchev, Dumortier, and De Vuyst 2002). Dans cette étude, la plèvre pariétale (costale, diaphragmatique et médiastinale) était inspectée à la recherche de zones anthracosiques et de plaques pleurales. La plèvre était ensuite entièrement détachée et étalée sur une surface plane. La présence de black spots

étaient évaluée par deux scores en fonction de leur surface et de leur épaisseur (Tableau 23). Un score global était ensuite calculé en multipliant ces deux scores afin de refléter le contenu total de la plèvre en black spots.

Score	Surface	Score	Epaisseur
0	Pas de black spot	0	Pas de black spot
1	<0,1 cm ²	1	Clairsemé
2	0,1–1 cm ²	2	Dense, sans surélévation
3	>1 cm ²	3	Dense, surélévation par rapport à la surface pleurale

Tableau 23: Modalités du calcul du score de black spot

Une quantification des corps asbestosiques a également été réalisée dans le parenchyme pulmonaire dans cette étude et pour cela, des échantillons de parenchyme pulmonaire et de plèvre pariétale ont été collectés et conservés dans du formol à 10 % filtrés.

Dans le cadre de notre étude, afin de garantir une rétention en particules dans les échantillons suffisante pour permettre les analyses en microscopie électronique, seuls les sujets de sexe masculin chez lesquels la rétention en corps asbestosiques était significative et pour lesquelles les trois types d'échantillons (poumons, plèvre saine, plèvre anthracosique) étaient disponibles en quantité suffisante ont été sélectionnés.

3.1.2. Préparation des échantillons

Pour chaque sujet un échantillon de parenchyme pulmonaire, de plèvre normale et de plèvre anthracosique ont été sélectionnés comme expliqué ci-après:

- les échantillons de parenchyme ont été sélectionnés en évitant la plèvre viscérale,
- les échantillons de plèvre ont été étalés sur une boîte de Pétri et examinés pour sélectionner une zone anthracosique et une zone normale distante d'au moins 1 cm en évitant également les plaques pleurales.

Les échantillons ont été rincés à l'eau Ultrapure® afin d'éliminer le formol et ont été séparés en deux échantillons :

- un premier échantillon d'un poids approximatif de 200 mg pour le parenchyme est de 100 mg pour les échantillons de plèvre ont été préparés selon le protocole Nanotrans n°1,
- un deuxième échantillon a été pesé puis placé dans une étuve à 60° pendant 24 heures afin de calculer le ratio poids humide/poids sec.

Les échantillons étaient préparés par série de trois ou six échantillons. Pour chaque série un blanc a été réalisé et analysé dans les mêmes conditions.

3.1.3. Analyse en MET

3.1.3.1. *Analyse de la concentration en particule*

Les grilles ont été analysées en MET selon le protocole Nanotrans n°1 présenté précédemment en utilisant un microscope TECNAI 12, FEI.

3.1.3.2. *Analyse de la composition chimique*

Les grilles ont été analysées avec un microscope électronique à transmission (JEOL 2010 LaB6) équipé d'un spectromètre X à dispersion d'énergie (IDFix 12.2.1, SAM'X).

Les ouvertures ont été analysées à un grossissement compris entre x30000 et x60000.

Trois classes de particules ont été définies :

- particules individuelles < 1 µm,
- particules individuelles > 1 µm,
- agrégats de particules ultrafines.

Dans le cas d'un échantillon riche en particules, au moins 20 particules de chaque classe ont été analysées au hasard. Pour les échantillons dans lesquels les particules étaient rares, l'ensemble des particules retrouvées sur cinq ouvertures ont été analysées.

Chaque particule détectée a été mesurée et analysée en EDX pour en déduire sa composition chimique élémentaire. Les agrégats de carbone étant facilement identifiables, ils n'ont pas été systématiquement analysés en EDX.

Les particules ont ensuite été classées en fonction de leur composition selon les classes suivantes :

- particules minérales: silice, silicates, particules calciques,
- particules métalliques : principalement composées de métaux ou d'oxydes métalliques,

- particules carbonées.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de chaque classe dans chaque échantillon et en pourcentage de composition élémentaire dans chaque classe.

3.1.4. Analyses statistiques

Une corrélation entre les scores de black spots et les concentrations en particules a été recherchée en utilisant le coefficient de corrélation robuste des rangs gamma déjà décrit dans l'étude précédente.

Les rétentions en particules des différents tissus ont été comparées avec le test de Friedman avec un niveau de significativité $\alpha=0,05$.

Les compositions des particules (par exemple pourcentage de particules de silices dans les échantillons de poumon et black spots) ont été comparées avec le test de Wilcoxon avec un niveau de significativité $\alpha=0,05$.

Ces analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.2.15.3.

3.2. Résultats

3.2.1. Patients

Les caractéristiques des sujets sont résumées dans le Tableau 24. L'âge moyen était de 74,1 (écart-type: 9,5 ans). Les concentrations en corps asbestosiques étaient comprises entre 1 et 138,4 x10³/g de tissu sec (Moy: 22,1; écart-type: 44). Le statut tabagique était inconnu pour trois sujets, un sujet était non-fumeur, quatre étaient fumeurs actifs et trois étaient ex fumeurs. Le poids sec moyen des échantillons était de 20,1 mg (écart-type: 6,1 mg) pour le parenchyme pulmonaire, 18,5 mg (écart-type: 11,1 mg) pour la plèvre normale et 14,8 mg (écart-type: 6,1 mg) pour la plèvre anthracosique.

Sujet	Age (ans)	Statut Tabagique	Plaques pleurales	Autres pathologies pulmonaires	Concentration en corps asbestosiques (x10 ³ /g)	Score de Black spot
1	79	Non fumeur	Oui	–	3.8	18
2	63	Fumeur	Oui	BPCO	4.2	60
3	71	Fumeur	Oui	BPCO, cancer pulmonaire	4.8	34
4	65	Fumeur	Oui	Asbestose, cancer pulmonaire	138.4	9
5	84	Inconnu	Oui	–	1.8	55
6	65	Fumeur	Oui	–	4.5	36
7	89	Inconnu	Non	–	1.5	65
8	77	Inconnu	Non	–	6.0	36
9	83	Ex fumeur	Oui	–	1.0	32
10	65	Ex fumeur	Oui	BPCO	55.2	13

Tableau 24: Caractéristiques des sujets inclus dans l'étude (BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive)

3.2.2. Concentrations en particules

Dans la Figure 24 est présenté un exemple de micrographie des particules retrouvées dans les différents échantillons chez un sujet (sujet n°3) pour lequel les poids secs des échantillons analysés étaient similaires (respectivement 15,3; 15,1 et 18,5 mg). Les charges particulaires paraissent similaires dans le parenchyme pulmonaire et la plèvre anthracosique et contrastent avec la rareté des particules dans les échantillons de plèvre saine.

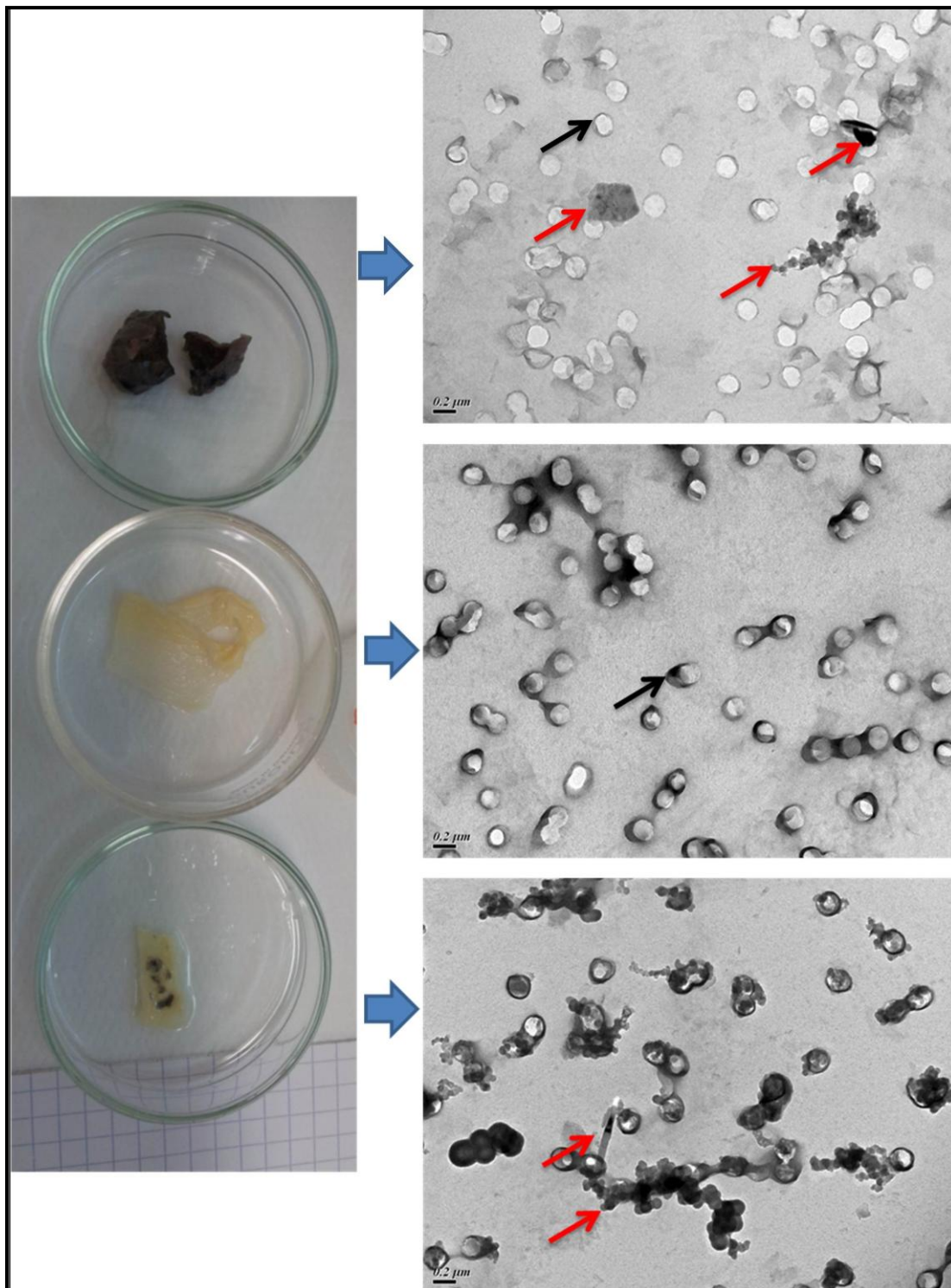


Figure 24: Aspect macroscopique des échantillons de parenchyme, plèvre saine et anthracosique et exemples de micrographies de ces tissus issues du même sujet. (Grossissement x30000). Les flèches rouges indiquent des exemples de particules, les flèches noires indiquent des pores.

Les concentrations en particules observées dans les différents échantillons sont représentées dans la Figure 25 et synthétisées dans le * σ =**écart-type**

Tableau 25. Les concentrations dans les parenchymes pulmonaires étaient comprises entre $0,04$ et $21,6 \times 10^9$ particules/g de tissu sec, avec une moyenne de $9,2$ particules/g (écart-type: $7,8 \times 10^9$ p/g). Les concentrations dans la plèvre anthracosique étaient comprises entre $4,1$ et $89,5 \times 10^9$ p/g de tissu sec avec une moyenne de $16,2$ p/g (écart-type: 26×10^9 p/g). Il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes de concentration des échantillons de parenchyme et de plèvre anthracosique. En revanche, les concentrations étaient significativement plus basses dans la plèvre normale comprises entre $0,3$ et $2,4 \times 10^9$ p/g avec une moyenne de $1,1$ p/g (écart-type: $0,6 \times 10^9$ p/g).

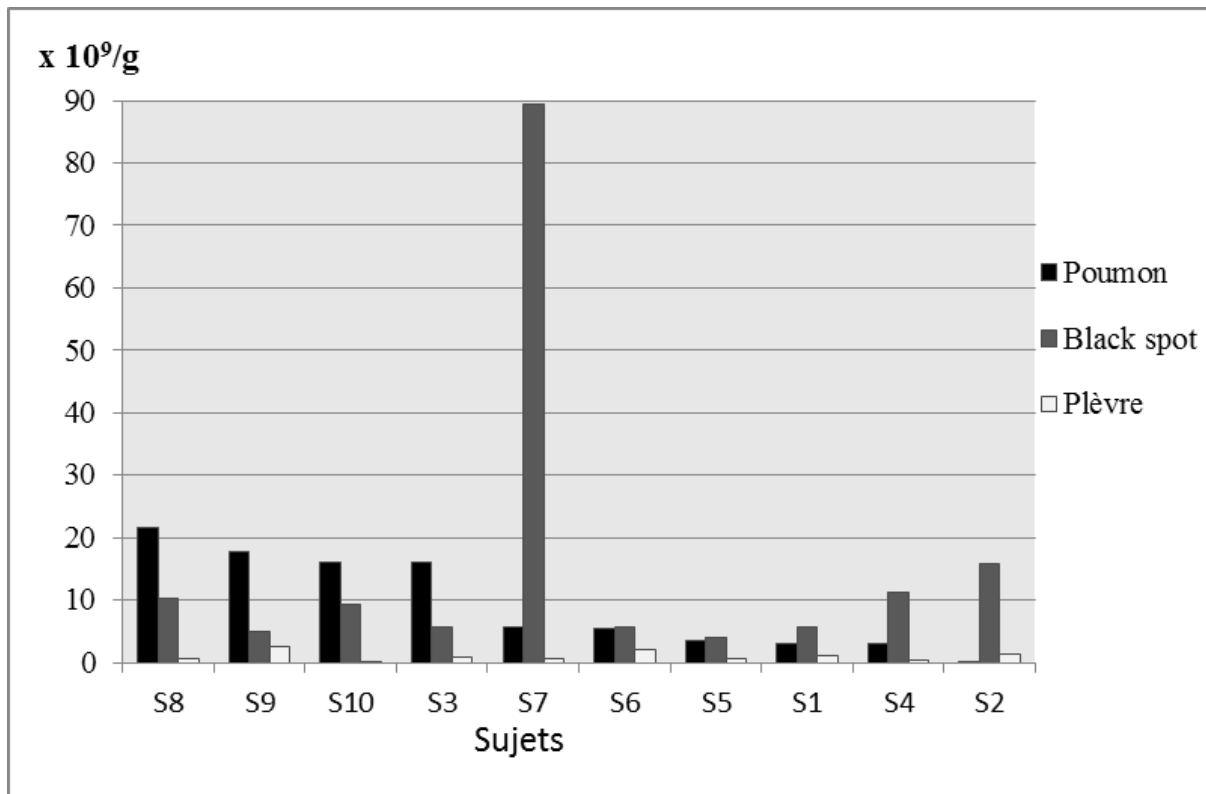


Figure 25: Concentration en particules en fonction du type d'échantillons. Les sujets sont rangés par ordre décroissant de concentration pulmonaire.

	Poumon		Black spots		Plèvre normale		p Value (test de Friedman)
Concentration moyenne totale (σ^*) $10^9/g$	9.2	(7.8)	16.2	(26)	1.1	(0.7)	0.002
Pourcentage moyen en part. individuelles (σ)	32.5%	(14.5)	42.8%	(16.2)	82.2%	(24.9)	0.003
Pourcentage moyen d'agrégats (σ)	Tous	65.3% (16.6)	54.1% (17.4)		17.8% (23.3)		0.003
	Carbonés	51.6% (20.3)	42.5% (19)		17.8% (23.3)		0.006
Diamètre moyen nm (σ)	623	(129)	533	(103)	296	(153)	0.002

* σ =écart-type

Tableau 25 : Concentrations et caractéristiques des particules observées dans les différents échantillons

Dans le poumon et la plèvre anthracosique, les particules retrouvées sont principalement des agrégats (respectivement 65,3 % et 54,1 % des particules). La plupart de ces agrégats étaient des agrégats de PUF de carbone qui représentaient respectivement 51,6 % et 42,5 % de toutes les particules soit 79% et 78,5 % des agrégats. Les autres particules étaient des particules individuelles (32,5% dans le poumon, 42,8% dans la plèvre anthracosique) et des fibres (2,2% ; 3%). En revanche, 82,2% des particules dans la plèvre normale étaient des particules individuelles, les autres étant des agrégats de carbone. Aucune fibre n'a été retrouvée dans la plèvre normale.

Le diamètre moyen des particules était similaire (pas de différence significative) dans le poumon et dans la plèvre anthracosique. Il était significativement plus petit dans la plèvre normale par rapport aux autres échantillons (poumon: 623 nm (écart-type: 129 nm), plèvre anthracosique: 533 nm (écart-type: 103 nm), plèvre normale: 296 nm (écart-type: 153 nm)). Cette différence significative était retrouvée à la fois pour les particules individuelles et les agrégats.

3.2.3. Composition chimique des particules

Il n'y avait pas de différence significative en termes de composition chimique entre les échantillons de parenchyme et de plèvre anthracosique. La composition chimique des particules était donc similaire comme le montre la Figure 26. A peu près la moitié des particules était des particules de carbone (poumon: 56,6% (écart-type: 18,1%), plèvre

anthracosique: 47,4% (écart-type: 18,4%). Les particules minérales représentaient plus d'un quart des particules dans le poumon et plus d'un tiers dans la plèvre anthracosique (27,5% (écart-type: 12,5%) contre 38,6% (écart-type: 13,9%). Les particules métalliques représentaient 14 % des particules (14% (écart-type: 7,5% contre 13,9 % (écart-type: 10,9%).

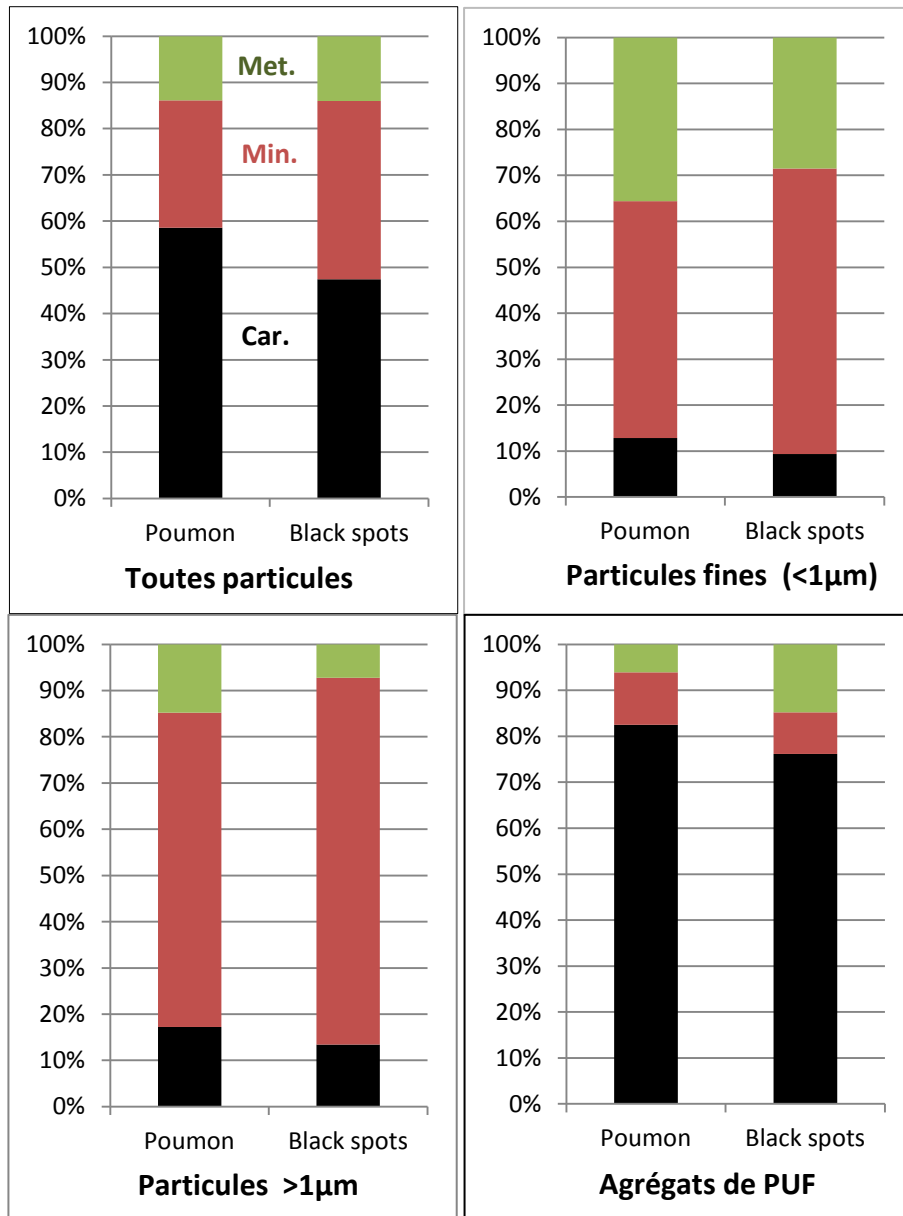


Figure 26: Composition des particules en fonction de leur taille (section noire: particules de carbone, section rouge : particules minérales, section verte : particules métalliques)

La composition des particules minérales est détaillée dans la Figure 27. Les silicates représentaient environ 70 % des particules minérales. Les autres particules minérales retrouvées étaient des particules de silice pure (23,2% dans les échantillons de poumon,

31,6% dans les black spots) et des particules calciques (1% dans les échantillons de poumon, 5.7% dans les black spots).

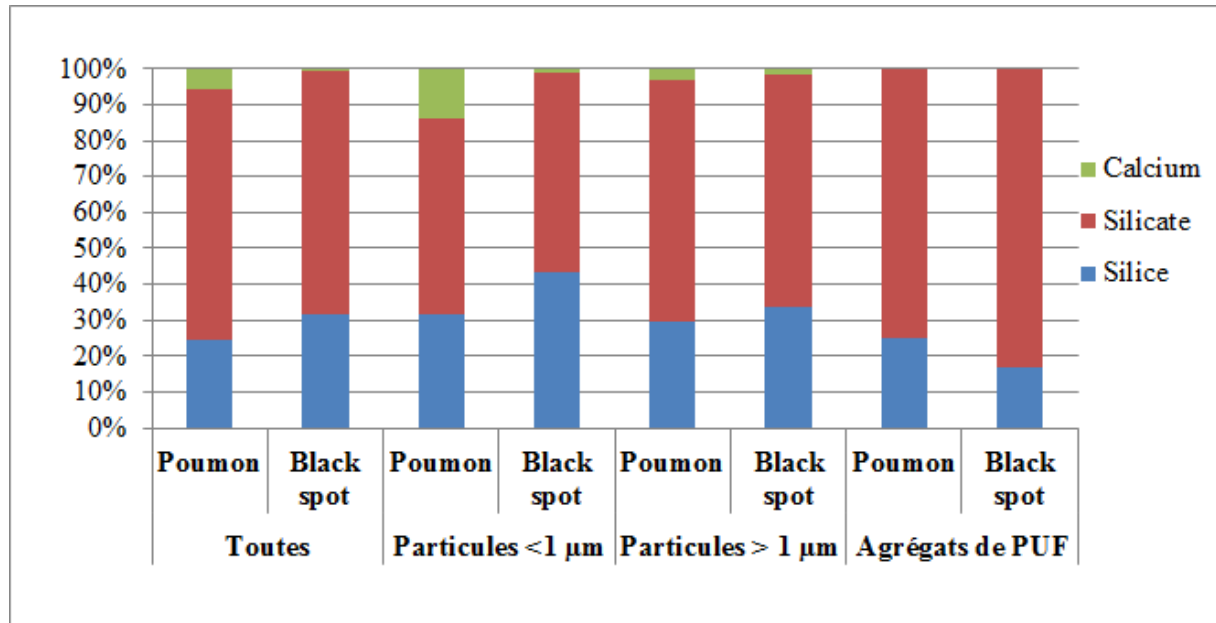


Figure 27: Composition chimique des particules minérales

La composition des particules métalliques est détaillée dans la Figure 28. Plus du tiers des particules métalliques étaient constituées de titane (36,6% dans le poumon, 37,3% dans le black spot). Près de la moitié des agrégats de NP était des agrégats de titane (49,1% et 47,3%). Des exemples de micrographies de particules de titane associées à leurs spectres EDX sont représentés dans la Figure 29.

Après les particules de titane, les particules métalliques les plus fréquemment retrouvées étaient les particules d'aluminium dans les black spots (poumon : 7,7%, black spots: 17,2%) et de fer dans le poumon (poumon : 28,5% black spot 10%).

D'autres types de particules ont été retrouvés tels que les particules de chrome, d'étain, de cérium ou des mélanges en proportion variable de ces éléments chimiques avec du fer, de l'aluminium, du titane ou du magnésium.

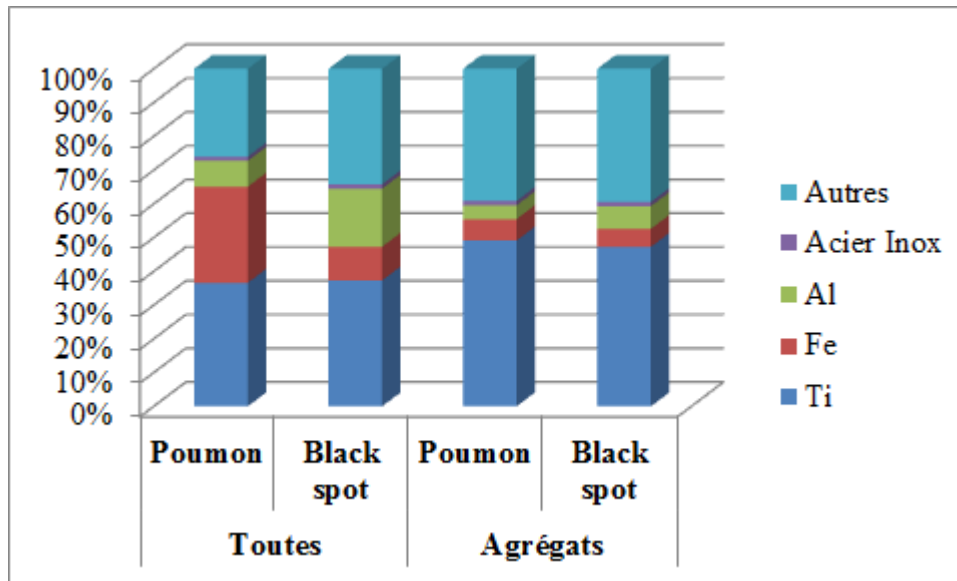


Figure 28 : Composition chimique des particules métalliques

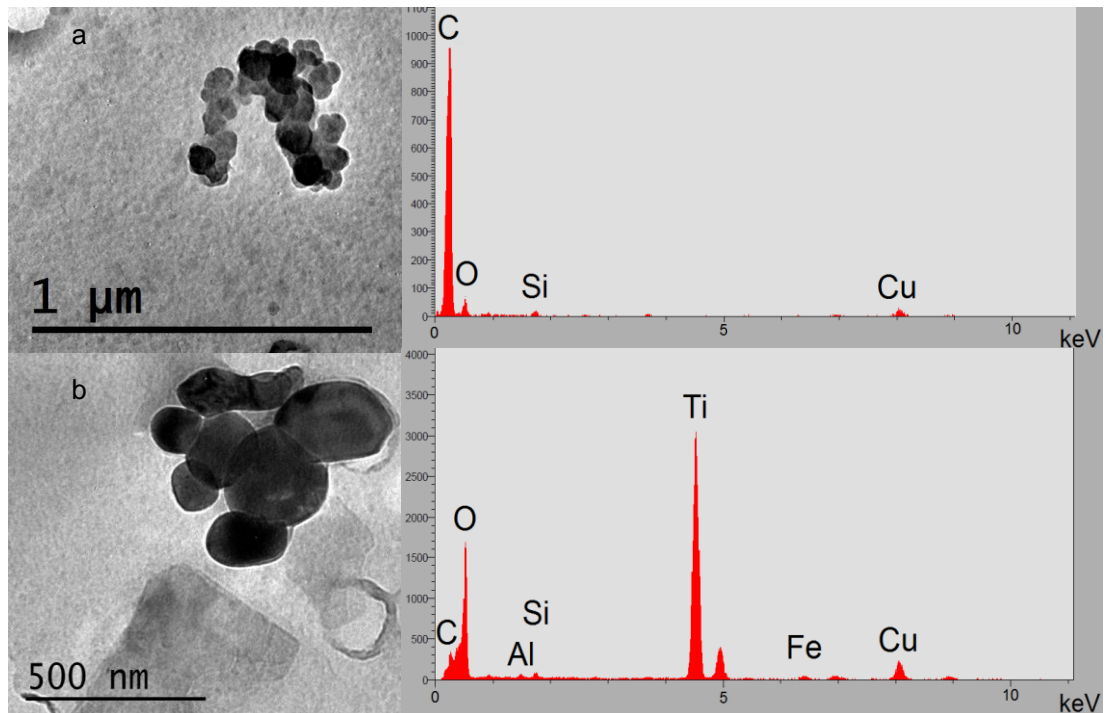


Figure 29: Micrographie et spectre EDX d'un agrégat de a) carbone (x 25000) b) titane (x 30000).

3.2.4. Analyses statistiques

Comme le montre le Tableau 26, il n'y avait pas de corrélation claire entre les rétentions en particules (exprimée en concentration numérique ou en surface développée) des échantillons de poumon et de plèvre anthracosique. Il n'y avait pas non plus de corrélation entre les rétentions pulmonaires en particules et les scores de black spot.

		Total	Particules. individuelles.	Agrégats	Agrégats de carbone
Rétention poumon VS plèvre anthracosique	Concentration (10 ⁹ p/g)	-0.15	-0.1	-0.06	0.23
	Surface (cm ² /g)	0.2	-0.01	0.31	0.66
Rétention poumon VS Score de Black spot	Concentration (10 ⁹ p/g)	-0.1	-0.2	-0.1	-0.16
	Surface (cm ² /g)	-0.1	-0.35	0.09	-0.01

Tableau 26 : Coefficient Gamma pour les analyses de corrélation effectuées entre les concentrations en particules des échantillons de poumon et de plèvre anthracosique et entre les concentrations en particules des échantillons de poumon et les scores de black spots.

3.3. Discussion

Si la translocation pleurale des fibres d'amiante avait déjà été évoquée dans la littérature (Boutin et al. 1996; Dodson and Atkinson 2006; Sebastien et al. 1980), nous n'avons pas retrouvé de donnée dans la littérature sur la caractérisation de particules non fibreuses nanométriques ou micrométriques à la fois dans le parenchyme pulmonaire et la plèvre.

Les analyses réalisées dans le cadre de cette étude ont permis de démontrer que les particules ultrafines et fines peuvent être retenues dans la plèvre pariétale et se concentrer dans des zones spécifiques en formant des structures macroscopiques, les black spots dans lesquels les concentrations en particules peuvent dépasser celles du parenchyme pulmonaire. Ces résultats sont en accord avec les études précédemment publiées sur les particules d'amiante dans lesquels les concentrations pleurales étaient parfois supérieures aux concentrations parenchymateuses (Dumortier et al. 2002). Boutin *et al* avait d'ailleurs suggéré pour expliquer

ces résultats que la concentration des fibres au niveau pleural faisait appel à des mécanismes actifs (Boutin et al. 1996).

Les black spots que nous avons analysés étaient principalement constitués d'agrégats de particules ultrafines très évocatrices de particules émises par des procédés de combustion telles que les particules diesel. Cette composition contraste avec les résultats de l'étude réalisée par Muller *et al* dans laquelle les particules d'alumino-silicate étaient prépondérantes faisant suggérer aux auteurs que les black spots étaient des lésions spécifiques de l'antracosis des mineurs de charbon (Muller, Schmitz, and Konstantinidis 2002). En revanche, nos résultats sont en accord avec Donaldson *et al* qui suggérait qu'une fraction de toutes les particules inhalées provenant de la pollution atmosphérique est susceptible d'atteindre la plèvre pariétale et de se déposer au niveau des stomates de la plèvre pour former les black spots (Donaldson et al. 2010). Cette déposition peut même avoir pour conséquence une inflammation pleurale ou la survenue de pathologies pleurales (Donaldson et al. 2013).

Il a été démontré que le transfert et la rétention des particules autour des stomates étaient taille-dépendants voire longueur-dépendants pour les nanotubes de carbone (Murphy et al. 2011). Cela explique probablement que les compositions des particules retrouvées dans les poumons et les black spots diffèrent par exemple par leur proportion en particules d'aluminium. Une différence de composition chimique peut également être expliquée par la formation de particules endogènes. En effet, comme évoqué dans l'étude précédente, des particules de fer endogènes peuvent résulter de processus inflammatoires ou d'une congestion notamment au niveau pulmonaire.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre les concentrations en particules des parenchymes pulmonaires et des black spots ni entre les concentrations en particules et les scores de black spots. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, il existe peu de données sur les mécanismes de translocation pleurale des particules et notamment leur cinétique. Les études expérimentales faites principalement sur les rongeurs montrent que la translocation des fibres d'amosite à la plèvre pariétale est rapide survenant une semaine après l'exposition (Bernstein et al. 2011; Broaddus et al. 2011; Fleury Feith and Jaurand 2013). Ce transfert peut être encore plus rapide par exemple pour les nanotubes de carbone retrouvés dans l'espace pleural un jour après l'exposition, avec un équilibre entre la translocation de l'espace alvéolaire et la clairance lymphatique atteint au bout de 26 jours (Mercer et al. 2010). Il était encore possible de retrouver ces particules dans le liquide pleural

336 jours après l'inhalation (Mercer et al. 2013). Un certain nombre de précautions doivent être prises lorsque l'on extrapole ces données expérimentales issues de modèles murins à l'homme compte tenu de différences anatomiques et microscopiques de la plèvre viscérale (Broaddus et al. 2011) et des différences dans les mécanismes de déposition pulmonaire prouvés expérimentalement pour les suies (particules diesel) et les poussières de charbon (Nikula et al. 1997). En effet, compte tenu de ces différences, il est très probable que les mécanismes de déposition pleurale chez l'homme nécessitent un temps plus long pour parvenir à un équilibre de l'ordre de la dizaine d'année (Miserocchi et al. 2008). Cela explique probablement que la charge pleurale ne soit pas le reflet de la charge pulmonaire à un instant t. De plus, dans la mesure où les black spots peuvent prendre de nombreux aspects macroscopiques différents (Muller, Schmitz, and Konstantinidis 2002), il est probable que les échantillons de plèvre anthracosique analysés diffèrent par leur épaisseur et donc le volume de black spot analysé. Il est également possible que la distribution des particules soit hétérogène dans les black spots. Enfin, il a été démontré que la concentration en particules dans le parenchyme pulmonaire variait de façon importante en fonction de la zone d'échantillonnage (Sebastien et al. 1980).

Nous pensons que la similarité des types de particules et de leur composition chimique entre la plèvre et le parenchyme est plutôt en faveur d'une translocation régionale de l'espace alvéolaire à l'espace pleural, décrit par Donaldson *et al* (Donaldson et al. 2010). Les particules peuvent être transférées sous forme libre ou transportées par les macrophages et ainsi migrer de l'espace alvéolaire à l'espace interstitiel soit par une voie para cellulaire, soit à travers des cellules épithéliales altérées (Broaddus et al. 2011). De cet espace interstitiel, elles peuvent diffuser de façon passive à l'espace pleural et être aspirées avec le liquide pleural à travers les stomates de la plèvre pariétale. Les stomates sont des ouvertures ovales ou rondes de 2 à 10 μm de diamètre qui permettent le passage de cellules ou de particules. Ils sont localisés principalement dans la plèvre médiastinale, diaphragmatique et en région postéro-basale où ils sont regroupés dans des zones spécifiques (De Vuyst 1997). Le drainage lymphatique à travers les stomates assure plus de 90% de l'élimination du liquide pleural (Agostoni and Zocchi 2007) ce qui en fait le mécanisme prépondérant par rapport aux autres mécanismes que sont la transcytose ou la pinocytose à travers les cellules mésothéliales (Zocchi 2002). Autour de ces stomates sont localisés des milky spots, zone qui sont riches en macrophages et lymphocytes qui participent à l'élimination des cellules et des particules de la

plèvre. Les black spots sont probablement formés par l'accumulation de particules et de substances exogènes au niveau de ces sites (De Vuyst 1997). L'absorption de particules exogènes situées dans l'espace pleural par la plèvre viscérale a également été rapportée (Pereira Ade et al. 1992) mais ce mécanisme a été rarement confirmé par les études récentes.

Les particules retrouvées dans la plèvre peuvent également provenir d'autres mécanismes de translocation comme la translocation systémique de particules inhalées ou ingérées (Bonner 2010).

La translocation de particules autres que les fibres au niveau de la plèvre humaine et des tissus mésothéliaux a été peu étudiée ou rapportée. Quelques case report déjà présentés en introduction ont rapporté le transfert dans l'espace pleural de NP de silice (Song, Li, and Du 2009; Song et al. 2011) ou une accumulation péritonéale de NP de carbone inhalées (Theegarten et al. 2010).

Il n'est pas possible au vu de nos résultats de conclure que la translocation des particules fines et ultrafines à la plèvre est significative sur le plan toxicologique. Le lien entre les pathologies pleurales bénignes (plaques pleurales) ou maligne (mésothéliome pleural) et la présence de particules dans la plèvre a été démontré pour les fibres d'amiante (Boutin et al. 1996) et est fortement suspecté pour les nanotubes de carbone (Donaldson et al. 2010). Il a notamment été démontré que des nanotubes de carbone inhalés pouvaient atteindre les tissus sous-pleuraux et induire une fibrose (Ryman-Rasmussen et al. 2009) ou atteindre l'espace pleural et induire une inflammation et une prolifération cellulaire (Xu et al. 2012). Les données pour les autres types de particules sont très limitées. Decologne *et al* ont montré que les particules de noir de carbone sont un cofacteur potentiel dans l'initiation et la progression de la fibrose pulmonaire et pleurale (Decologne et al. 2010). De plus, des mésothéliomes pleuraux ou péritonéaux ont été induits chez des rongeurs après des expositions à des particules de nickel (Kane 2006). Les données expérimentales sur les NP issues de la combustion (Donaldson et al. 2005) et les NP métalliques telles que les NP de dioxyde de titane (Shi et al. 2013) indiquent qu'elles peuvent induire un stress oxydatif et potentiellement être génotoxiques ce qui suggère un potentiel carcinogène pour la plèvre.

Le protocole Nanotrans a permis pour la première fois dans cette étude, d'analyser de façon quantitative et qualitative la rétention d'agrégats de particules ultrafines dans le parenchyme et la plèvre. Cependant des limites sont à discuter. Premièrement, ce protocole est coûteux autant en argent qu'en temps humain, ce qui a limité l'étude à 10 patients avec pour résultat

une faible puissance statistique. Cela peut expliquer l'absence de différence significative entre les tissus ou l'absence de corrélation entre les scores de black spots et la rétention pulmonaire en particules. De plus, nous avons sélectionné les patients en fonction de leur concentration parenchymateuse en corps asbestosiques afin de garantir une rétention pulmonaire ou pleurale suffisante en particules. Nos données sont donc issues de patients qui ont probablement présenté des expositions professionnelles importantes et sont difficilement extrapolables à la population générale même si ce n'était pas le but initial de l'étude.

Une autre limite est que la zone de prélèvement des échantillons pleuraux et parenchymateux n'est pas connue et diffère donc probablement entre les patients ce qui peut expliquer également certains des résultats non significatifs. En effet, la rétention parenchymateuse en particules (Sebastien et al. 1980) et la clairance lymphatique (Egashira et al. 2013) varient de façon importante en fonction de la région analysée.

3.4. Conclusion

Cette étude démontre que les particules fines et ultrafines peuvent se concentrer dans la plèvre pariétale. Ces particules se concentrent préférentiellement dans des black spots à des concentrations similaires ou supérieures aux concentrations pulmonaires. Compte tenu des similitudes en termes de composition chimique retrouvées entre les particules pleurales et pulmonaires et des données actuelles de la littérature sur la physiologie pleurale, nos résultats suggèrent une translocation régionale via l'espace pleural. Les particules retrouvées sont principalement des particules ultrafines de carbone issues de la combustion. Des études complémentaires permettraient de préciser les risques représentés par cette translocation sur le plan toxicologique.

Chapitre 3 :
Caractérisation des particules nanométriques dans l'air

1. Introduction

Dans le cadre de la mise en place de l'étude Nanotrans, il est rapidement apparu nécessaire de réunir le plus d'information possible sur la caractérisation en MET et le comptage des particules nanométriques dans les situations d'expositions professionnelles ou environnementales afin de pouvoir faciliter les observations des particules retrouvées dans les tissus ou fluides biologiques. Pour cela, une veille active de la littérature concernant la caractérisation des expositions humaines aux particules nanométriques et contenant des données de caractérisation en MET a été réalisée. Ces références ont été implémentées dans la base de données Evalutil

[https://ssl2.isped.u-bordeaux2.fr/eva_003/\(S\(ehuokmaqdh53h02ct4mihibb\)\)/Accueil.aspx](https://ssl2.isped.u-bordeaux2.fr/eva_003/(S(ehuokmaqdh53h02ct4mihibb))/Accueil.aspx).

Cette analyse de la littérature scientifique a révélé que les données disponibles concernaient essentiellement la caractérisation des NP manufacturées (fabrication et mise en œuvre) et les expositions liées aux fumées de soudage. Peu de données existaient sur l'exposition aux particules ultrafines dans d'autres conditions d'exposition et sur la caractérisation en microscopie électronique des particules liées à la fumée de tabac. Afin de pallier ces manques, nous avons collaboré à une étude sur la caractérisation des particules émises dans un procédé de meulage et effectué une analyse en MET des fumées recueillies dans une machine à fumer. Dans la troisième partie de ce manuscrit seront présentés les résultats de ces deux études.

2. Caractérisation des expositions professionnelles aux particules émises dans le cadre d'un chantier de réfection de rail par meulage dans le métro parisien

2.1. Contexte

Comme discuté précédemment, comparées aux particules de plus grande taille, les PUF ont des propriétés accrues de déposition pulmonaire ou de translocation systémique (HEI 2013). Elles ont également une plus grande surface réactive ou la capacité d'adsorber des substances potentiellement toxiques leur conférant un plus grand potentiel toxique (Kumar et al. 2014; WHO 2013). Les expositions humaines aux PUF peuvent résulter de la pollution atmosphérique induite par le transport routier (plus de 60% des émissions totales de PUF), par le transport non routier (ferroviaire, aérien, maritime : environ 19%) et les sources de combustion domestiques (environ 13%) (Paasonen et al. 2013). Les expositions aux PUF peuvent également survenir dans le cadre professionnel avec de multiples sources d'émission possibles : combustion de carburant (gaz d'échappement des véhicules), activités de fonderie, activités de soudure, ablations laser ou procédés mécaniques tels que la découpe, le polissage, le meulage (Brouwer, Gijssbers, and Lurvink 2004).

Ce dernier procédé peut être utilisé dans le cadre de la maintenance de voies ferrées pour corriger ou prévenir les défauts liés au vieillissement des rails. En effet, avec le temps, une déformation des rails peut survenir et provoquer une augmentation des risques d'accident et des vibrations ou des nuisances sonores pour les usagers ou le voisinage. La correction de ces déformations nécessite l'intervention d'entreprises sous-traitantes spécialisées et repose sur des trains meuleurs.

En France, environ 8000 travailleurs sont impliqués dans les travaux de maintenance ferroviaire dans les enceintes souterraines (métro, RER). Il existe cependant très peu de données sur leurs expositions professionnelles notamment aux substances chimiques émises dans le cadre de ces activités (ANSES 2015).

En 2009, les travailleurs de l'entreprise exploitante du métro parisien, par le biais de leurs représentants au comité d'hygiène de sécurité et des conditions de travail ont sollicité l'intervention de leur service médical du travail pour évaluer leurs expositions professionnelles et les mesures préventives à appliquer dans ce type de travaux. Dans la mesure où ces activités n'étaient pas documentées dans la littérature, les médecins du travail ont sollicité par le biais d'un appel d'offre, l'intervention de l'équipe du Pr Garrigou, responsable du département Hygiène, Sécurité & Environnement de l'institut universitaire de

technologie de Bordeaux. Afin de compléter les métrologies réglementaires insuffisantes pour évaluer le risque lié aux particules ultrafines (Brouwer, Gijssbers, and Lurvink 2004), il a sollicité notre participation à la mise en place d'un projet de recherche dirigé par un comité scientifique et un comité de pilotage. L'objectif de l'étude présentée ci-après était de mieux caractériser l'exposition des travailleurs impliqués dans les chantiers de réfection de voie par meulage et en particulier d'évaluer leur exposition aux nuisances chimiques notamment aux particules fines et ultrafines.

2.2. Matériel et méthodes

Avant son démarrage, l'étude a été présentée par les médecins du travail aux travailleurs impliqués dans les travaux de maintenance afin d'obtenir leur consentement.

Ce projet a réuni des hygiénistes industriels, des médecins du travail et des ergonomes dans une approche pluridisciplinaire. Une étude pilote avec analyse ergonomique de l'activité et réalisation de métrologies a été effectuée à l'occasion de chantiers de maintenance sur deux lignes différentes, durant deux nuits consécutives, les 24 et 25 Octobre 2009. Compte tenu de ces résultats préliminaires, deux scénari d'exposition ont été choisis pour l'étude finale: les opérateurs qui suivent le train meuleur et le conducteur de train.

Les analyses présentées ci-après ont été réalisées dans deux lignes du métro parisien durant les nuits du 25 et 26 octobre 2011. Ces analyses incluent des analyses métrologiques (mesure de l'exposition aux produits chimiques par échantillonnage personnel) visant évaluer l'exposition des travailleurs aux émissions gazeuses et particulaires, les mesures et la caractérisation des émissions de particules ultrafines et l'analyse ergonomique des activités des travailleurs. Les lignes ont été sélectionnées en concertation avec les médecins du travail et les responsables de la maintenance en raison de caractéristiques topographiques (effet cuvette, section de ligne comprenant moins de ventilation) permettant de garantir que les analyses réalisées témoignent du pire scénario d'exposition.

2.2.1. Description du process

Les travaux de maintenance ont lieu en dehors des heures d'exploitation, c'est-à-dire la nuit. Avant le début de chaque chantier de maintenance, une réunion de chantier est organisée avec les responsables de production, les responsables maintenance, les responsables sécurité, les

opérateurs de la ligne concernée et ceux de la société propriétaire du train meuleur afin de planifier le déroulement du chantier.

Durant chacune des deux nuits d'analyse, à l'occasion de cette réunion, un rappel des objectifs et du déroulement des analyses était fait, puis les travailleurs étaient équipés du matériel de prélèvement et des ceintures thoraciques pour les analyses ergonomiques.

La section de la ligne choisie est ensuite contrôlée par les opérateurs de la ligne afin d'éliminer les déchets potentiellement inflammables et protéger les éléments de la voie tels que les câbles électriques et le matériel de signalisation. Après coupure de la ventilation et de l'alimentation électrique, le train meuleur est conduit jusqu'au chantier. Le déplacement du train repose sur le moteur diesel principal. Il est également muni d'un moteur accessoire qui assure le fonctionnement des wagons meuleurs. Un wagon meuleur est constitué de six meules (trois par rail).

Un premier aller retour du train meuleur est réalisé sans meulage afin de mesurer les caractéristiques des rails et définir le nombre d'aller retour à réaliser durant le chantier. Durant le meulage, le conducteur est placé dans une cabine en surpression alimentée en air filtré.

Plusieurs opérateurs suivent le train :

- un opérateur de l'entreprise de maintenance (nommé ci-après le contrôleur meulage) contrôle le déroulement du meulage et pour cela interagit régulièrement avec le conducteur en entrant dans la cabine,
- plusieurs autres opérateurs de l'entreprise de transport (nommés ci-après les contrôleurs de voies) contrôlent l'intégrité des voies (rails, organes d'alimentation et de sécurité), ramassent les scories et gèrent les événements indésirables tels que les départs de feu.

D'autres opérateurs de la compagnie de transport restent sur le quai des stations pour assurer une surveillance.

Tous les opérateurs (à part ceux restant dans la cabine) étaient équipés de demi-masques à cartouche filtrante anti poussières type P3.

2.2.2. Evaluation de l'exposition aux agents chimiques

2.2.2.1. *Stratégie d'échantillonnage*

Des échantillons individuels d'air ont été prélevés en zone respiratoire durant les opérations de meulage sur trois travailleurs :

- la première nuit sur le conducteur et le contrôleur meulage,
- la seconde nuit sur le conducteur et le contrôleur de voie.

Les travailleurs ont été équipés de sacs à dos contenant le matériel d'échantillonnage.

Les échantillons d'air ont été collectés avec des pompes AirChek XR5000 (SKC, Inc), réglées au débit de 2 l/min, munies de filtres quartz de 37 mm de diamètre pour mesurer les poussières inhalables et les composés métalliques (Al, Cr, Fe, Ni, Pb, Zn) suivant la norme NF ISO 15202-3 (AFNOR 2005), les particules diesels suivant la méthode NIOSH 5040 (NIOSH 2003) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) particulaires suivant la norme NF X 43-294 (AFNOR 1995).

Pour les HAP gazeux, le prélèvement reposait sur une pompe réglée sur un débit de 0,3 l/min et un filtre Amberlite XAD[®]-2.

Les échantillons pour l'analyse du formaldéhyde ont été prélevés avec une pompe Pocket Pump[®] (SKS, Inc), réglée sur un débit de 0,1 l/min, munie d'un filtre de silice imprégné de 2,4 Dinitrophenylhydrazine et avec un échantillonneur passif Radiello[®] (Sigma-Aldrich[®]) suivant la norme NF X 43-264 norm (AFNOR 2002).

Pour le benzène, la même pompe réglée sur un débit de 0,1 l/min, munie d'un filtre à charbon actif était utilisée ainsi qu'un échantillonneur passif Gabie[®] développé par l'Institut National de Recherche de Sécurité (Delcourt and Sandino 2000) suivant la norme NF X 43-267 (AFNOR 2004).

2.2.2.2. *Méthode analytique*

Les méthodes analytiques utilisées et les limites de quantification correspondantes ont été résumées dans le Tableau 27

Poussières inhalables	Particules Diesel	Métaux dans les poussières inhalables		Formaldéhyde	Benzène	HAP		
						Particulaire	Gazeux	
Gravimétrie	EGA-FID	ICP-AES	ICP-MS	HPLC-DAD	GC-FID	HPLC-Fluo		
0,20 mg	CE : 5,1 µg	Al : 2,5 µg	Cr : 0,25 µg	0,1 µg	4,09 µg	Naphtalène	10 ng	50 ng
	CO : 15µg	Fe : 25 µg	Pb : 0,25 µg			2-méthylnaphtalène	10 ng	50 ng
	CT : 15 µg		Zn : 2,5 µg			Acénaphthylène	10 ng	25 ng
			Ni : 1 µg			Fluorène	10 ng	10 ng
						Phénanthrène	10 ng	10 ng
						Anthracène	10 ng	10 ng
						Fluoranthène	10 ng	10 ng
						Pyrène	10 ng	10 ng
						2-méthylfluoranthène	10 ng	25 ng
						Benzo[α]anthracène	10 ng	10 ng
						Chrysène	10 ng	10 ng
						Benzo[j]fluoranthène	10 ng	10 ng
						Benzo[e]pyrène	3 ng	3 ng
						Benzo[β]fluoranthène	10 ng	10 ng
						Benzo[k]fluoranthène	10 ng	10 ng
						benzo[α]pyrène	3 ng	3 ng
						Dibenzo[α, h]anthracène	10 ng	3 ng
						Benzo[g,h,i]perylène	10 ng	10 ng
						Indeno[1,2,3,cd]pyrène	10 ng	10 ng

Tableau 27 : Méthodes utilisées pour les métrologies et limites de quantification correspondantes. EGA – FID: analyse thermique évolutive avec détecteur à ionisation de flamme, GC-FID: chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme, HPLC-DAD : chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur UV à barrette de diodes, HPLC-Fluo HPLC: HPLC avec détecteur de fluorescence, ICP/AES: spectrométrie d'émission optique par torche à plasma, ICP/MS: spectrométrie de masse par torche à plasma.

2.2.3. Caractérisation des émissions de particules fines et ultrafines

Le protocole d'analyse a été construit à partir des recommandations techniques du NIOSH pour le mesurage et l'identification des émissions de nanoparticules en milieu de travail (Methner et al. 2010).

2.2.3.1. *Stratégie d'échantillonnage*

Les analyses quantitatives ont été réalisées avec deux compteurs de particules à condensation CPC 3007[®] (TSI, USA), permettant la détection de particules dans la gamme de taille de 0,01 à 1 µm. Le premier CPC a été placé dans la cabine du train meuleur et le second sur le quai de la station.

Pour les analyses en MET, des échantillons d'air ont été collectés en utilisant des pompes AirChek XR5000 (SKC, Inc) réglées au débit d'air de 2 l/min munies de filtres en polycarbonate précarbonés de 37 mm de diamètre et de 0,2 µm de porosité (Whatman®). Afin d'éviter la saturation des filtres, plusieurs durées d'échantillonnage ont été choisies sur la base de calculs prévisionnels reposant sur les premières mesures obtenues avec le CPC durant l'étude pilote.

Dix échantillons ont été prélevés dans la cabine du train et sur le quai : deux avant le meulage pour évaluer le bruit de fond, quatre durant la première nuit et quatre durant la seconde nuit.

Des scories de meulage ont également été prélevées sur les voies afin de réaliser des analyses complémentaires en microscopie électronique à balayage (MEB).

2.2.3.2. *Caractérisation en MET et MEB*

Pour les analyses en MET, les filtres ont été traités par une seconde évaporation de carbone. Les particules piégées entre les deux couches de carbone ont été transférées sur des grilles de cuivre pour MET indexée de 200 mesh, selon la technique du laveur de Jaffe déjà décrite.

Les grilles ont été analysées avec un microscope électronique à transmission (JEOL 2100 LaB6) équipé d'un spectromètre à EDX (IDFix 12.2.1, SAM'X). Les analyses EDX ont été réalisées avec une tension d'accélération de 200 kV, un tilt de 7° et un temps de collection de 60-200 secondes.

Les grilles ont d'abord été analysées à un grossissement compris entre x80 et x1000 pour vérifier leur qualité et leur uniformité. Des ouvertures ont ensuite été analysées au hasard à x30000. Les particules détectées ont été classées en fonction de leur taille en quatre classes (<50 nm, 50-100 nm, 100-500 nm, >500 nm) et leur aspect (particules individuelles, agrégats). Les analyses EDX ont été réalisées soit sur 50 particules soit sur toutes les particules de 5 ouvertures dans le cas de filtres peu chargés.

Afin de compléter ces analyses en MET, des fragments de scories ont été découpés, fixés par un adhésif double face sur des portes objets en aluminium et analysés avec un MEB (ZEISS EVO 50 LaB6) équipé avec une sonde EDX (IDFix 12.2.1, SAM'X) en utilisant une tension d'accélération de 15 kV.

2.2.4. Caractérisation de l'intensité physique

L'intensité physique a été caractérisée par monitoring de la fréquence cardiaque avec un cardiofréquencemètre PolarTeam. Il consiste en une ceinture thoracique portée par les opérateurs (conducteur de train et contrôleurs meulage et voie) sur l'ensemble de leurs activités durant les deux nuits. Ces données ont été interprétées par un ergonome avec le logiciel Propulse Ergo (Propulse Ergo, CardiSport). Ce logiciel prend en compte trois indicateurs: le coût cardiaque relatif, la fréquence cardiaque moyenne et la fréquence cardiaque crête permettant de classer l'intensité physique en légère, modérée, lourde et très lourde selon la méthode de Meunier *et al* résumée dans le Tableau 28 (Meunier 1997, 2000, 2010).

a	Score	Fréquence cardiaque moyenne (BPM)	Fréquence cardiaque au 99 ^{ème} percentile (BPM)	Coût cardiaque relatif (%)
	5 points	> 120	>150	> 40
	4 points	110 à 119	140 à 149	30 à 39
	3 points	100 à 109	130 à 139	20 à 29
	2 points	90 à 99	120 à 129	10 à 19
	1 point	80 à 89	110 à 119	0 à 9

b	Score global	Intensité physique
	13 à 15 points	Très lourde
	10 à 12 points	Lourde
	7 à 9 points	Assez lourde
	4 à 6 points	Modérée
	1 à 3 points	Légère

Tableau 28 a et b : Critères d'établissement du score d'intensité physique

2.3. Résultats

2.3.1. Exposition des travailleurs aux agents chimiques

Durant la première nuit, les prélèvements ont été réalisés pour le conducteur et le contrôleur meulage pendant le procédé de meulage ce qui correspond à une durée d'échantillonnage de 1h39.

Durant la deuxième nuit, l'échantillonnage a duré 2h20 (durée du meulage) pour le conducteur et 3h30 (durée du meulage + fin des activités de contrôle des voies) pour le contrôleur voies.

2.3.1.1. Fraction particulaire

Un résumé des résultats concernant la fraction particulaire est présenté dans le Tableau 29.

Polluants	Contrôleur meulage	Conducteur		Contrôleur voie
	25.10.2011 mg/m ³	25.10.2011 mg/m ³	26.10.2011 mg/m ³	26.10.2011 mg/m ³
Poussières inhalables	4,68	1,36	1,28	1,57
Fer	0,89	<0,13	0,1	0,3
Aluminium	0,17	0,14	0,13	0,44
Nickel	<0,005	<0,005	<0,004	<0,003
Chrome	0,003	<0,0013	<0,0009	<0,0007
Plomb	<0,0013	<0,0013	<0,0009	<0,0007
Zinc	<0,012	<0,013	<0,009	<0,0067
Carbone élémentaire	0,7	0,32	0,09	0,25
Carbone organique	0,59	0,33	0,17	0,32
Carbone total	1,29	0,65	0,26	0,57

Tableau 29 : Synthèse des résultats de l'évaluation des expositions professionnelles aux agents chimiques particuliers (octobre 2011)

Le niveau d'exposition aux poussières inhalables varie en fonction du type d'activité : ce niveau était trois fois plus élevé pour le contrôleur meulage (4,68 mg/m³) que pour les autres opérateurs. Le contrôleur voie était également trois fois plus exposé aux poussières de fer (0,89 mg/m³). En revanche, le contrôleur voie était le plus exposé aux poussières d'aluminium, à une concentration trois fois supérieure à celle des autres opérateurs (0,44 mg/m³). Des traces de chrome ont été retrouvées seulement dans les échantillons du contrôleur voie. Les autres métaux (nickel, plomb, zinc) étaient en dessous des limites de détection.

Le contrôleur meulage était le plus exposé aux particules diesel (2 à 5 fois plus que les autres opérateurs) avec une concentration de 1,29 mg/m³ et avec une légère prédominance du carbone élémentaire.

Les concentrations ont été pondérées sur 8h afin de pouvoir les comparer aux valeurs moyennes d'exposition (VME) au poste de travail en ne considérant comme exposantes que

les activités réalisées sur le sites des chantiers (INRS 2012). Ces résultats sont présentés dans le Tableau 30.

Agents chimiques	VME	Contrôleur meulage		Conducteur				Contrôleur voie	
		25.10.2011		25.10.2011		26.10.2011		26.10.2011	
		(mg/m ³)	% VME	(mg/m ³)	% VME	(mg/m ³)	% VME	(mg/m ³)	% VME
Poussières inhalables	10	1	10%	0,28	2,8%	0,28	3%	0,6	6%
Fer	10	0,18	1,8%	<L.D.	–	0,029	0,3%	0,11	1%
Aluminium	10	0,035	0,35%	0,037	0,4%	0,028	0,3%	0,17	2%
Nickel	1	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–
Chrome	2	0,0007	0,04%	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–
Plomb	0,1	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–
Zinc	10	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–	<L.D.	–
Carbone élémentaire	–	0,15	–	0,07	–	0,03	–	0,09	–
Carbone organique	–	0,12	–	0,06	–	0,07	–	0,12	–
Carbone total	0,3	0,27	90%	0,13	43%	0,08	27%	0,22	73%

Tableau 30: Comparaison des résultats pondérés sur 8h aux valeurs moyennes d'exposition au poste de travail.

Compte tenu de la durée courte de la phase de meulage (moins de 2h30 sur l'ensemble de la nuit de travail), l'exposition aux poussières inhalables ne dépassait pas le dixième de la valeur limite. De même, l'exposition aux poussières métalliques ne dépassait pas 2% des valeurs limites.

L'exposition aux particules diesel atteint en revanche quasiment les seuils des valeurs guides recommandées pour les travaux souterrains (INRS 2007) pour le contrôleur meulage (90% de la valeur guide). Cette exposition était légèrement moins importante pour le contrôleur voie (73% de la valeur guide). L'exposition dans la cabine n'était pas négligeable variant selon les nuits entre 27 et 43% de la valeur guide.

2.3.1.2. *Fraction gazeuse*

Les concentrations de benzène et de formaldéhyde étaient en dessous de la limite de détection. Pour les HAP, les analyses n'étaient positives que pour le naphthalène dans la cabine mais étaient largement en deçà de la valeur limite recommandée de 50 mg/m³ (0,84 µg/m³ le 27 Octobre and 0,74 µg/m³ le 28 Octobre). Tous les autres HAP étaient en dessous de la limite de détection.

2.3.2. Caractérisation des particules fines et ultrafines

2.3.2.1. *Concentration en particules*

Les résultats de la mesure de la concentration instantanée en particules par les CPC durant les deux nuits d'observation sont présentés dans la Figure 30.

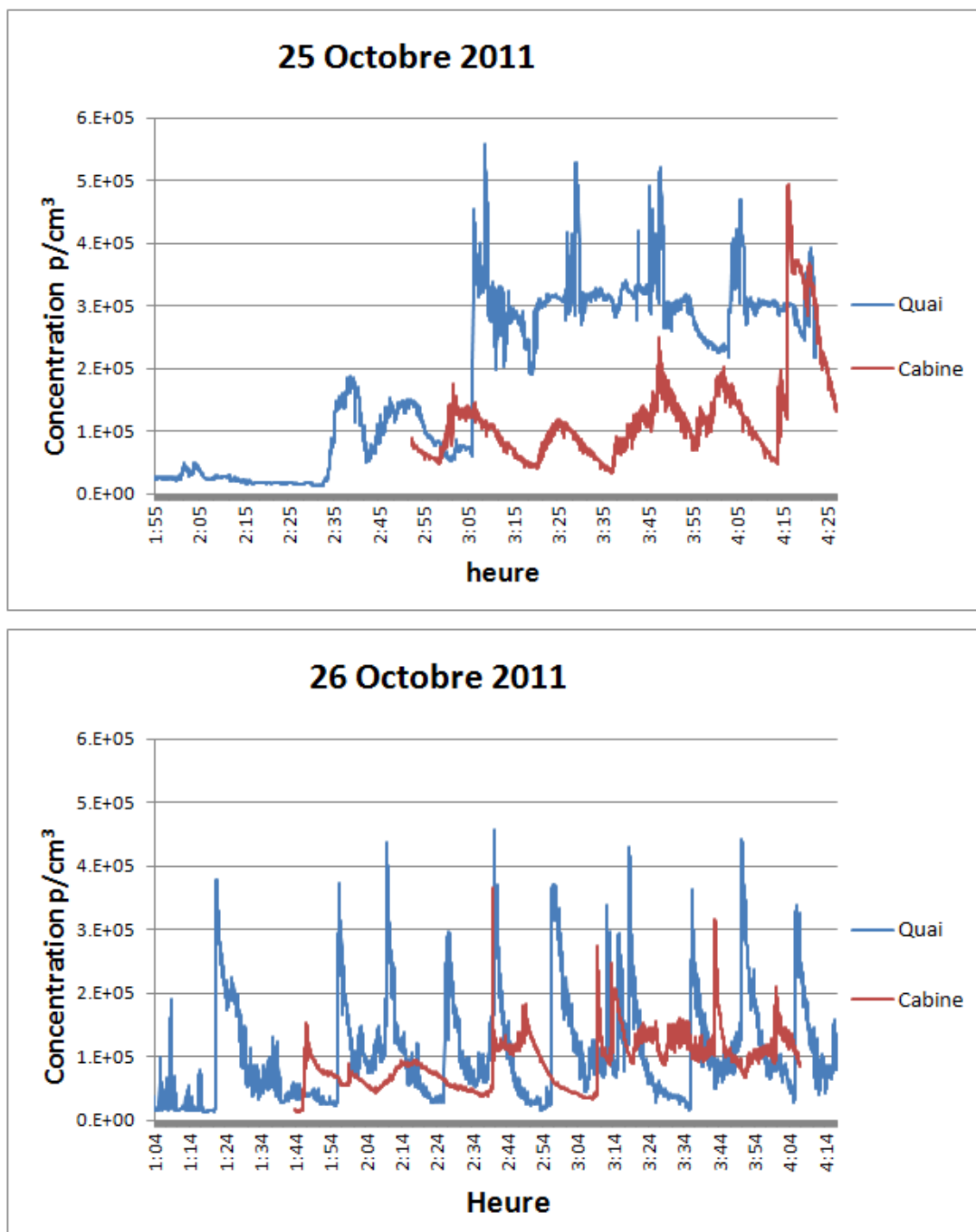


Figure 30 : Evolution de la concentration en particules dans l'air durant les deux nuits de chantier de maintenance par meulage Octobre 2011.

Le bruit de fond était compris entre 15 000 et 25 000 particules/cm³.

Sur les quais, comme attendu, des pics d'émission de particules ont été observés à chaque passage du train. L'intensité des pics était similaire que le passage se fasse avec (comme dans le cas du pic de 1h56 le 25 Octobre) ou sans meulage (pic à 1h24 le 25 Octobre). Ces pics dépassent respectivement 550 000 et 450 000 p/cm³ la première et seconde nuit. Les pics peuvent également être liés à d'autres activités comme observé la deuxième nuit à 1h09 avec le passage d'un métro sur la voie opposée qui a provoqué un pic à 200 000 p/cm³.

Ces pics sont suivis d'une rapide décroissance en une dizaine de seconde avec stabilisation autour de 250 000 p/cm³ la première nuit et 100 000 p/cm³ la seconde nuit.

Dans la cabine, les pics observés étaient liés à des ouvertures de la porte lorsque le contrôleur meulage devait interagir avec le conducteur. Les concentrations particulières ont atteint 500 000 p/cm³ le 24 et 350 000 p/cm³ le 25 octobre. Après ces pics, la décroissance de concentration dans la cabine était plus progressive en quelques minutes avec stabilisation autour de 100 000 p/cm³.

2.3.2.2. Analyse en MET et MEB

Les détails de l'échantillonnage pour les analyses MET sont présentés dans le Tableau 31.

Echantillon	Jour	Heure	Lieu	Durée de prélèvement (sec)
1	24.10.2011	02:55	Bruit de fond Cabine	120
2	24.10.2011	02:50	Bruit de fond Quai	180
3	24.10.2011	03:47	Cabine 5 ^{ème} passage	312
4	24.10.2011	03:45	Quai 5 ^{ème} passage	480
5	24.10.2011	04:04	Cabine 6 ^{ème} passage	66
6	24.10.2011	04:03	Quai 6 ^{ème} passage	93
7	25.10.2011	02:01	Cabine 2 ^{ème} passage	300
8	25.10.2011	02:41	Quai 2 ^{ème} passage	60
9	25.10.2011	03:30	Cabine 7 ^{ème} passage	93
10	25.10.2011	03:30	Quai 7 ^{ème} passage	60

Tableau 31 : Détails de l'échantillonnage pour les analyses en MET.

Plus de 85% des particules observées étaient des agrégats. Ces agrégats avaient un diamètre pour la plupart supérieur à 100 nm et étaient constitués de particules individuelles de taille comprise entre 20 et 30 nm, avec un aspect typique de particule diesel.

Les analyses EDX ont confirmé que plus de 99% des particules collectées étaient des particules carbonées. Des exemples de micrographie de deux de ces particules carbonées sont présentés dans la Figure 31. Le spectre de ces particules est constitué d'un pic principal de carbone associé à des pics liés à des éléments traces tels que l'arsenic, le plomb et le soufre (le pic de cuivre est lié à la grille de cuivre).

Avant le meulage, aucune particule de moins de 100 nm n'a été retrouvée dans la cabine, elles représentaient environ 20 % des particules collectées sur le quai. Durant le meulage, les particules de moins de 100 nm représentaient respectivement environ 11% et 6% des particules collectées sur les 8 filtres (quatre sur le quai, quatre dans la cabine).

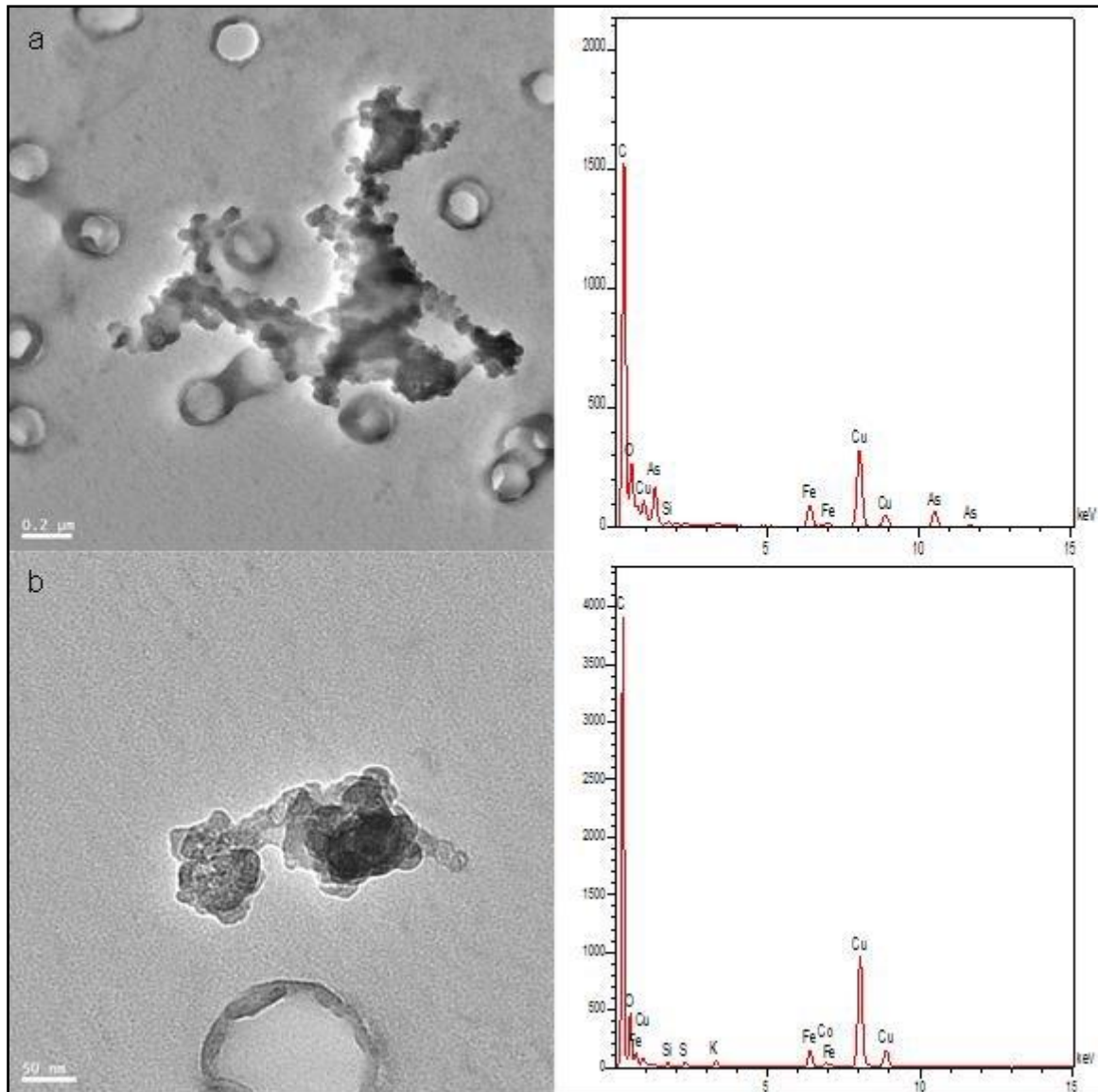


Figure 31 : Deux exemples de micrographie en MET d'agrégats de carbone et spectres EDX associés (a: x5000, b: x20000)

De rares particules individuelles métalliques de fer et de titane ont été retrouvées sur deux filtres. Leur taille était toujours supérieure à 250 nm. Afin de vérifier si des nanoparticules métalliques étaient émises pendant le meulage, un échantillon de scorie a été analysé en MEB. Des particules métalliques sphériques composées d'oxydes de fer et de manganèse de taille supérieure à 100 nm ont été retrouvées lors de cette analyse (Figure 32). Aucune particule similaire n'a été retrouvée dans les filtres analysés en MET.

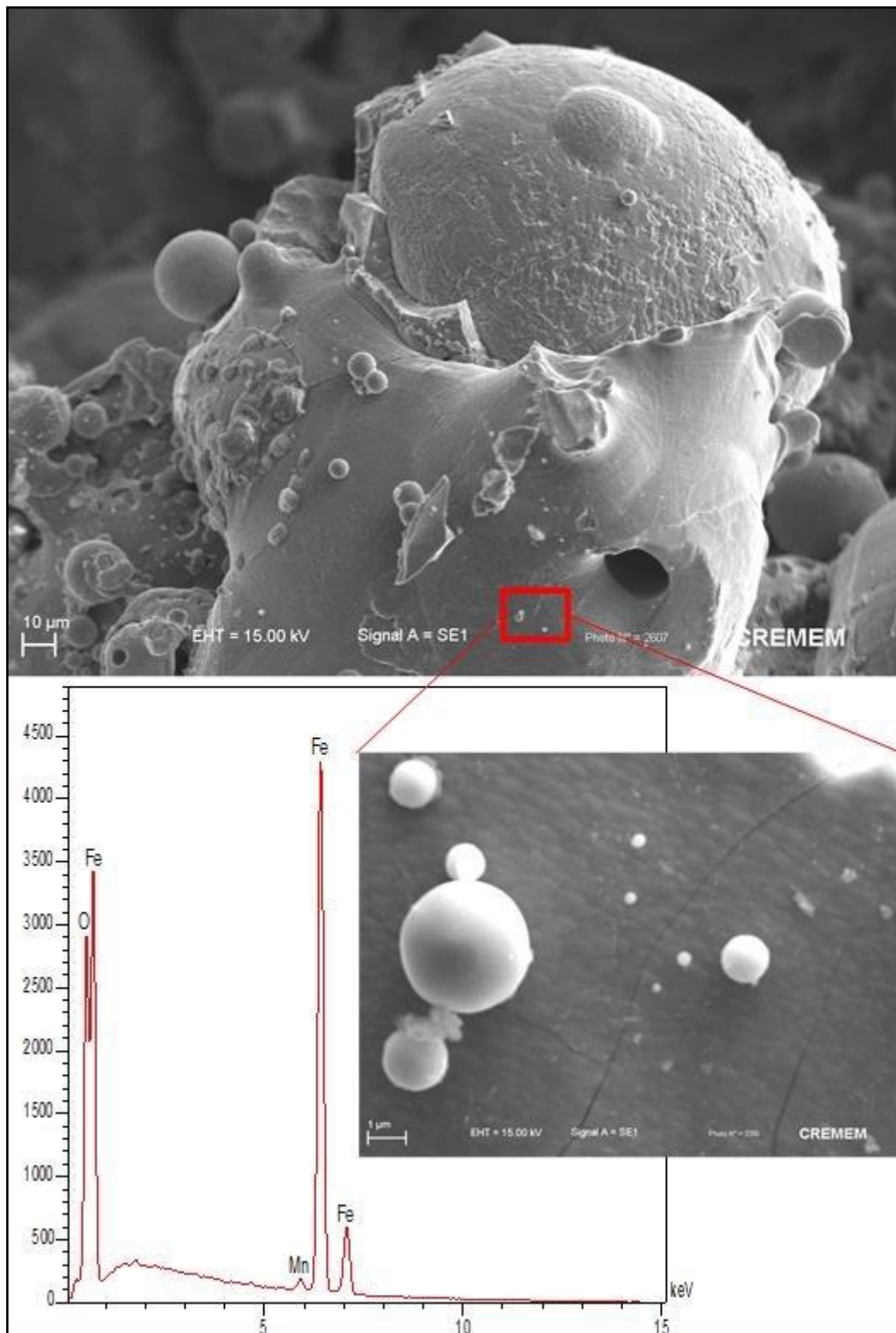


Figure 32 : Micrographies MEB d'échantillons de scories et spectre EDX associé (micrographie principale: x4000, zoom: x20000).

2.3.3. Caractérisation de l'intensité physique

Les résultats de la caractérisation de l'intensité physique des opérateurs travaillant sur les voies sont présentés dans la Figure 33. L'intensité physique atteignait des niveaux importants (assez lourd à très lourd) et était plus importante pour le contrôleur voie. Cette intensité physique était principalement expliquée par les déplacements sur la voie ou dans la station, pour monter dans le train ou le suivre. Ces activités représentaient en durée la moitié des activités. Le maintien de postures penchées en avant ou agenouillées représentait 20% de la durée totale des activités et expliquait également dans une moindre mesure cette intensité physique.

La charge physique était majorée par l'utilisation des masques de protection respiratoires. Des pics d'intensité physique étaient retrouvés lors des situations de travail où les opérateurs devaient gérer des incidents techniques ou des départs de feu.

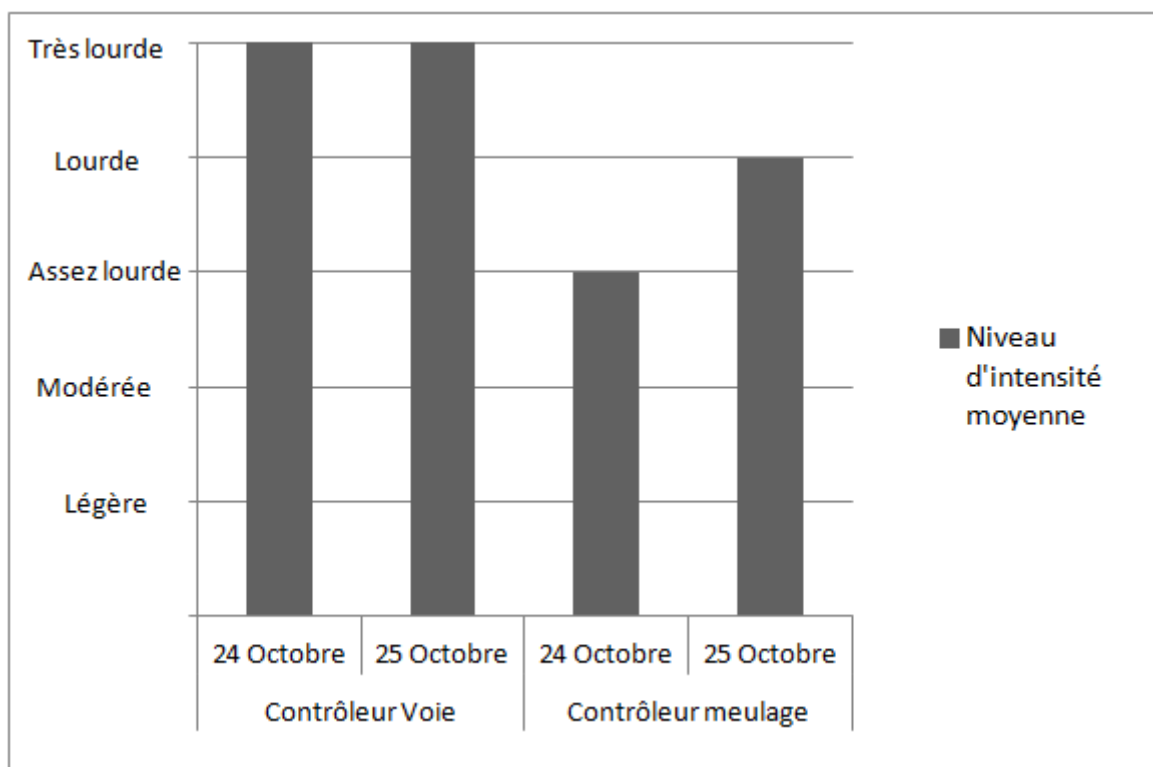


Figure 33: Niveau d'intensité physique moyenne pour les contrôleurs voies et meulage.

2.4. Discussion

Les concentrations en PM10 et PM2.5 (particules de diamètre aérodynamique inférieur à respectivement 10 et 2,5 μm) dans le métro dépassent habituellement celles observées dans l'air extérieur ou dans l'air intérieur. L'ANSES a estimé que les concentrations en PM10 dans les métros français étaient comprises entre 0,07 et 0,12 mg/m^3 avec des pics pouvant atteindre 1 mg/m^3 durant les chantiers de maintenance. Les particules retrouvées sont principalement composées de fer et de carbone. Les particules de fer (et les autres particules métalliques telles que les particules de cuivre, de chrome, de nickel et de manganèse) peuvent être émises par l'usure des matériaux lors du freinage, lors du contact roue-rail ou lors du contact du train avec le système d'alimentation électrique. Les sources possibles d'émission de particules de carbone sont le freinage, l'usure des roues ou la remise en suspension de particules diesel émises pendant les activités de maintenance. Des particules de silice peuvent provenir du ballast ou du sable utilisé lors des freinages d'urgence ou des manœuvres en pente pour augmenter l'adhérence des roues sur les rails (ANSES 2015).

Le bruit de fond en poussières inhalables était variable dans l'air des stations de métro lors des analyses préliminaires réalisées durant les deux nuits de l'étude pilote en 2009. En effet, la première nuit, la concentration était de 0,89 mg/m^3 mais seulement de 0,50 mg/m^3 la deuxième nuit. Des traces de fer (0,08 mg/m^3) et de nickel (0,03 mg/m^3) n'ont été retrouvées que lors de la première nuit. Les analyses étaient en dessous de la limite de détection pour les autres métaux (aluminium, chrome et plomb). Comme cela était prévisible, les analyses réalisées dans le cadre de cette étude en 2011, montrent que les activités de meulage augmentent les concentrations en poussières inhalables et en composés métalliques, mais également les concentrations de particules diesel émises par les moteurs assurant les mouvements du train et des meules.

Les expositions aux poussières inhalables, aux poussières métalliques et aux composés chimiques gazeux étaient suffisamment en deçà des valeurs limites pour conclure à un risque faible pour la santé des travailleurs. En revanche, nous avons mis en évidence une exposition aux particules diesel atteignant presque la valeur guide recommandée pour les opérateurs travaillant sur la voie et la moitié de cette valeur pour le conducteur. Compte tenu des données de la littérature sur la toxicité des particules diesel, ces résultats ont été jugés particulièrement

préoccupants. En effet, compte tenu de leur surface réactive importante et de leur capacité à adsorber des substances chimiques irritantes, les fumées diesel peuvent provoquer une irritation des muqueuses oculaires et respiratoires voire une altération de la fonction respiratoire (Morgan, Reger, and Tucker 1997; Rudell et al. 1996; Sydbom et al. 2001; Xu et al. 2013). Des liens avec des pathologies pulmonaires chroniques telles que l'asthme (Sydbom et al. 2001), la bronchite chronique obstructive (Hart et al. 2006) ou la possibilité de potentialisation d'allergènes respiratoires (Ristovski et al. 2012) ont également été décrits. Les études expérimentales et épidémiologiques ont également démontré que les expositions aux particules diesels pouvaient être un facteur de risque de maladies coronariennes (Moller et al. 2011). Mais le potentiel carcinogénique des particules diesel est l'effet probablement le plus documenté et le plus préoccupant. En effet, les études épidémiologiques réalisées sur des populations de mineurs, de travailleurs du secteur ferroviaire ou de conducteurs poids lourd ont retrouvé une augmentation du risque de cancer du poumon chez les travailleurs les plus exposés (Benbrahim-Tallaa et al. 2012; Wichmann 2007). Les études expérimentales ont montré que ce potentiel carcinogénique concerne à la fois les fumées diesel totales et la fraction particulaire (Benbrahim-Tallaa et al. 2012). Ces données ont justifié une modification du classement par le centre international de recherche contre le cancer, qui les considère comme cancérigènes certains (catégorie 1) pour l'homme depuis 2012 (IARC 2012). Un lien avec d'autres tumeurs comme les tumeurs de la vessie est également suspecté mais les données sont insuffisantes pour conclure pour le moment (Boffetta and Silverman 2001; Guo et al. 2004).

Nos résultats ont soulevé la question de l'amélioration des mesures préventives pour les travailleurs. Ces mesures doivent rester compatibles avec les règles de sécurité ferroviaire. Cette étude a donc été suivie de mesures visant à améliorer les équipements de protection collective avec par exemple la mise en place d'un filtre à particules sur le moteur diesel accessoire, l'amélioration de la pressurisation de la cabine du train meuleur. La compagnie de transport a également décidé d'investir dans un programme de remplacement des motorisations diesel par des trains électriques dans les chantiers de maintenance pour lesquels cela était techniquement possible.

Les mesures en continu des concentrations en particules fines et ultrafines ont montré des différences dans les niveaux de concentration atteints et les profils évolutifs. Les pics de

concentration et la concentration moyenne étaient plus élevés lors de la première nuit. Bien que de nombreux facteurs puissent être évoqués, il est probable que ce soit les différences topographiques qui expliquent ces résultats. En effet, la première nuit d'observation s'est déroulée dans une station simple alors que la deuxième nuit s'est déroulée dans une station double (c'est à dire avec 2 voies et 2 quais) avec par conséquent un volume de dilution plus important.

L'un des résultats surprenants de notre étude est l'absence de particules ultrafines fines métalliques dans les échantillons analysés en MET en contradiction avec l'hypothèse initiale des médecins du travail qui a en partie motivé l'étude. Cette absence pourrait être liée à un artefact de la méthode de prélèvement qui aurait pu être améliorée par l'utilisation d'un échantillonneur sélectif en taille tel qu'un impacteur basse pression à détection électrique (ELPI) (Brouwer, Gijbers, and Lurvink 2004). Cependant, nous avons analysé des scories de meulage et n'avons pas non plus retrouvé de particules métalliques ultrafines. Par conséquent, compte tenu des résultats des mesurages d'exposition aux produits chimiques, nous avons conclu que les pics de particules observés avec les CPC étaient dus aux émissions de particules par les moteurs diesel et non à des émissions de particules ultrafines métalliques lors du meulage.

Bien que nous ayons retrouvé de nombreuses études sur l'évaluation des expositions lors de la manipulation de nanoparticules manufacturées (Demou, Peter, and Hellweg 2008; Demou, Stark, and Hellweg 2009; Shepard and Brenner 2014; Curwin and Bertke 2011), ou lors d'activités de soudage (Cena et al. 2015; Gomes et al. 2014; Gomes et al. 2012; Cena et al. 2014), nous n'avons pas retrouvé de données publiées sur l'évaluation des expositions professionnelles dans des activités de meulage de rails. Nos résultats contrastent cependant avec les publications documentant les activités de meulage en général et retrouvant des émissions de particules ultrafines métalliques. Par exemple, les particules ultrafines émises lors du meulage d'acier dans une chambre de mesure de 1 m^3 atteignent des concentrations de $80\,000 \text{ particules/cm}^3$ (Zimmer and Maynard 2002). Des concentrations de $12\,000$ à $20\,000 \text{ particules/cm}^3$ ont également été retrouvées en milieu de travail dans des activités de meulage à la main (Elihn and Berg 2009).

Dans notre étude, le bruit de fond était compris entre $15\,000$ et $25\,000 \text{ particules/cm}^3$, ce qui est comparable aux concentrations retrouvées dans les métros de Stockholm ou Londres. A

Stockholm, la concentration moyenne était de 12 000 particules/cm³, principalement des particules ultrafines. Des particules diesel et des particules métalliques contenant principalement du fer étaient observées (Midander et al. 2012). A Londres, des niveaux similaires de concentration particulaire ont été retrouvés avec 67% de la masse constituée d'oxyde de fer (Seaton et al. 2005). Les données du Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA, Paris, France) indiquent que les concentrations particulières dans Paris varient entre 15 000 et 40 000 particules/cm³ en fonction du lieu de prélèvement. A titre de comparaison, dans l'habitacle d'un véhicule automobile, cette concentration peut atteindre 65 000 particules/cm³ dans le centre de Paris et 91 000 particules/cm³ en banlieue parisienne (Le Bihan and Malherbe 2007). De nombreuses activités "indoor" peuvent également émettre des particules ultrafines telles que cuisiner, brûler des bougies, utiliser un sèche-cheveu. Ces activités sont susceptibles d'induire des concentrations en particules dans l'air intérieur supérieures à 200 000 p/cm³ (Ji 2010; Ji et al. 2010) voire supérieures à 500 000 p/cm³ (Gu et al. 2015).

L'analyse de l'intensité physique a mis en évidence des niveaux inattendus de charge physique pour les opérateurs évoluant sur les rails. Plus qu'une indication de la pénibilité liée à ces activités, ces résultats permettent d'interpréter les résultats de l'analyse des expositions aux agents chimiques dans une démarche ergotoxicologique (Mohammed-Brahim and Garrigou 2009). En effet, une forte demande physique induit une augmentation des fréquences pulmonaires et cardiaques et des flux de vascularisation cutanée résultant en une augmentation des expositions cutanées et respiratoires.

De plus, les niveaux élevés de charge physique observés pour le contrôleur meulage a soulevé la question de l'efficacité réelle des masques de protection respiratoire utilisés (demi-masques avec filtres anti poussières P3). En effet, dans les efforts physiques intenses, les débits expiratoires peuvent dépasser ceux utilisés lors des tests d'homologation réalisés pour la certification de ces équipements (Kaufman and Hastings 2005) et induire des fuites avec une diminution de leur efficacité (He et al. 2014). Ces équipements ne sont donc pas adaptés aux activités impliquant une forte demande physique surtout que dans le cas de notre étude, leur efficacité sur les particules diesel n'est pas garantie (Penconek, Drazyk, and Moskal 2013). Notre étude a donc permis un changement des équipements de protection respiratoire avec le remplacement des masques par des cagoules à air ventilé.

2.5. Conclusion

L'étude réalisée a combiné des analyses ergonomiques de l'activité, des mesures individuelles de l'exposition aux produits chimiques et la caractérisation des émissions des particules fines et ultrafines dans une approche ergotoxicologique. Cette approche a permis de démontrer que les expositions principales des travailleurs étaient liées aux émissions de particules ultrafines par les moteurs diesel et non à des particules métalliques émises lors du meulage comme cela était suspecté. Ces expositions sont majorées par la forte demande physique qui augmente l'exposition respiratoire et peut limiter l'efficacité des masques. Notre étude a donc permis d'améliorer les connaissances sur les expositions des travailleurs durant les activités de maintenance ferroviaire par meulage. Ces connaissances sont indispensables aux médecins du travail dans le cadre de leur mission d'évaluation des risques professionnels et leur mission de conseiller des employeurs et des travailleurs pour le choix et l'utilisation des équipements de protection individuelle.

3. Caractérisation des émissions de particules ultrafines dans la fumée de tabac

3.1. Objectifs

La composition chimique de la fumée de tabac a fait l'objet de nombreuses publications (Baker and Dixon 2006). Les données sur la fraction particulaire concernent principalement la composition chimique ou la distribution granulométrique (Anderson, Wilson, and Hiller 1989; Brinkman et al. 2012; Daher et al. 2010; Hiller, Anderson, and Mazumder 1987) mais paradoxalement, il existe peu de données sur l'aspect en MET des particules de la fumée de tabac dans l'air ou dans les tissus et fluides biologiques.

L'objectif de ces analyses était de caractériser les particules fines et ultrafines contenues dans la fumée de tabac afin de permettre leur repérage lors de l'analyse d'échantillons de fluides et tissus biologiques.

Afin de répondre à cet objectif, les analyses ont porté sur la caractérisation des particules contenues dans la fumée d'une machine à fumer et sur l'analyse d'échantillons de parenchyme pulmonaire de souris exposées à cette machine à fumer.

3.2. Matériel et méthode

3.2.1. Caractérisation des particules contenues dans la fumée de tabac

3.2.1.1. *Caractéristiques de la machine à fumer*

Les tests ont reposé sur une machine à fumer (MAF) mise à disposition gracieusement par le laboratoire Inserm U955 (Faculté de médecine Paris Est Créteil) dont une photographie est présentée dans la Figure 34.

Le fonctionnement de la MAF repose sur des seringues de 60 ml reliées aux chambres d'exposition par des tubulures. Une cigarette est branchée sur chaque seringue. Les seringues sont actionnées par des pistons selon des cycles de 45 secondes se succédant comme suit :

- aspiration de la fumée/remplissage de la seringue en 15 secondes,
- vidange du contenu de la seringue dans la chambre d'exposition en 15 secondes,
- exposition des souris durant 15 secondes,
- ventilation des chambres d'exposition en fin de cycle.

Une cigarette est consommée au bout d'environ six cycles en environ cinq minutes.

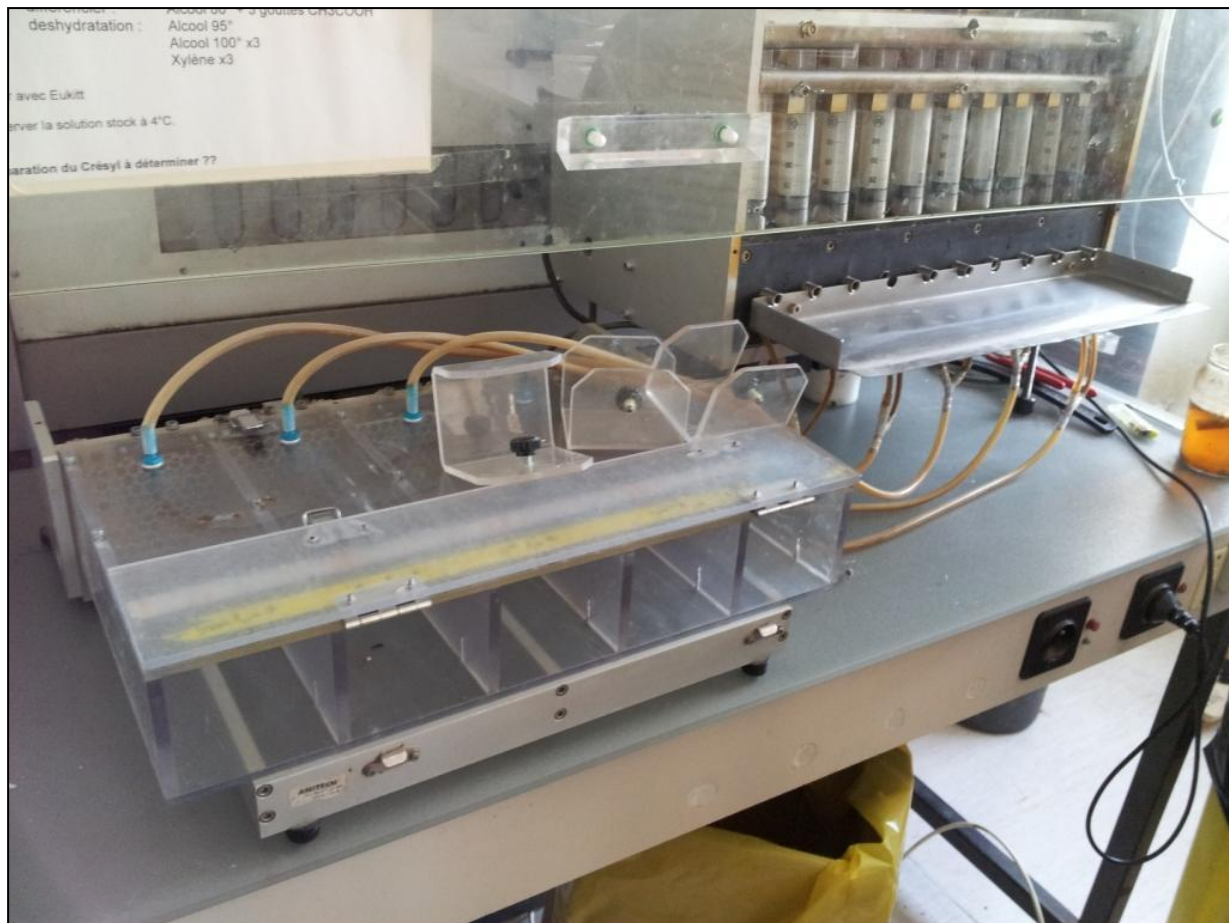


Figure 34 : Machine à fumer du laboratoire Inserm U955. Université Paris Est Créteil

3.2.1.2. Matériel utilisé

- Cigarettes : Cigarette Tobacco Health Research (University of Kentucky)-référence : 3R4F 12 / 2006,
- mesure de la concentration instantanée en particules : compteur à noyau condensation CPC 3007[®] (TSI, USA),
- recueil des échantillons d'air:
 - pompe avec un débit réglé sur 1,907 l/min. Deux modes de recueil ont été utilisés:

- filtre en polycarbonate pré carboné de 0,4 μm de porosité de 25 mm de diamètre monté sur cassette,
- grilles de MET en cuivre de 200 mesh pré carbonée (transfert d'une membrane de polycarbonate pré carbonée de 0,2 μm). Trois grilles sont posées sur le filtre, pompe en fonctionnement.

3.2.1.3. *Plan de prélèvement :*

Les mesures et prélèvements suivants ont été réalisés :

- mesure de la concentration instantanée en particules avec le CPC :
 - évaluation du bruit de fond,
 - mesure de la concentration en particules au niveau d'une tubulure avec une distance tubulure/capteur d'environ 5 cm,
 - mesure de la concentration en particules au niveau des chambres d'exposition,
- recueil de particules :
 - aspiration directe d'une cigarette durant 15 secondes,
 - aspiration directe d'une cigarette durant 30 secondes,
 - aspiration d'une cigarette entière (temps approximatif 40 sec),
 - recueil au niveau de la chambre d'exposition.

3.2.2. Protocole d'analyse des échantillons pulmonaires de souris

Deux échantillons pulmonaires de souris Balb/C exposées à la fumée de tabac de la MAF fournis gracieusement par le laboratoire INSERM 955 ont été analysés. Ces souris étaient exposées à 19 cigarettes par jour, 2h par jour durant 14 jours, puis traitées par injection intra péritonéale de PBS (200 μl / jour).

Les échantillons pesant 38,5 et 21,4 mg (poids humide) ont été digérés selon le protocole Nanotrans dans 5 ml d'hypochlorite filtré.

Les grilles ont été analysées avec un microscope électronique à transmission TECNAI 12, FEI.

3.3. Résultats préliminaires

3.3.1. Concentration en particules

Le bruit de fond dans le laboratoire était d'environ 8500 particules/cm³.

Les concentrations en sortie de seringues au niveau de la tubulure sont comprises durant les cycles entre 150 000 et 250 000 particules/cm³. Au niveau de la chambre d'exposition, pendant le fonctionnement de la MAF, les concentrations sont comprises entre 250 000 et 400 000 particules/cm³.

3.3.2. Analyse en MET

Les analyses préliminaires réalisées en MET permettent de retrouver des agrégats de PUF de carbone de taille le plus souvent supérieure à 500 nm et constitués de particules individuelles de taille comprise entre 20 et 30 nm. L'aspect de ces particules est similaire à celui des particules retrouvées dans les échantillons pulmonaires de souris (Figure 35).

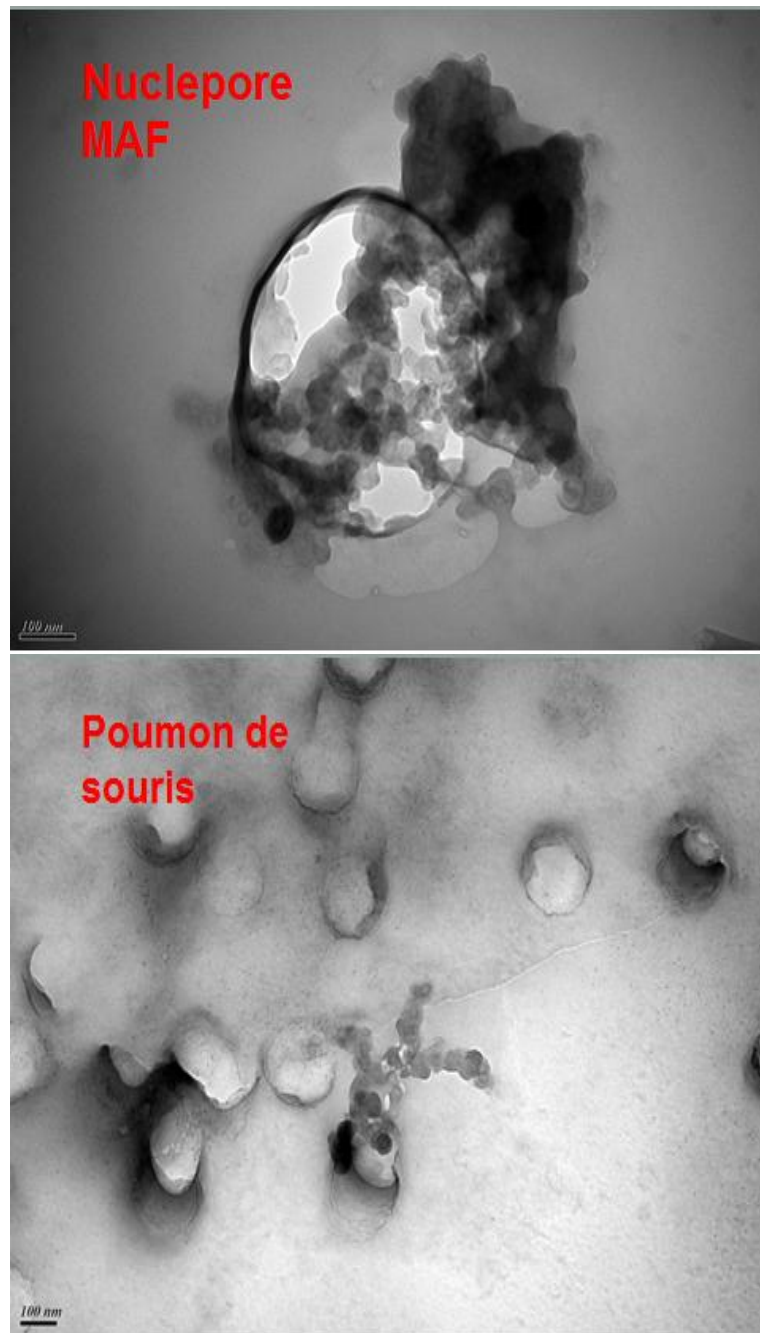


Figure 35 : Micrographies d'agrégats de particules ultrafines de carbone retrouvés dans les échantillons de fumée de tabac et dans le parenchyme pulmonaire de souris exposées à la fumée de tabac (grossissement x 30000).

De nombreuses publications rapportent la présence possible de nombreux éléments métalliques traces dans la fumée de tabac (aluminium, cadmium, sélénium, plomb, arsenic par exemple) (Ajab et al. 2014; Bernhard, Rossmann, and Wick 2005; Pappas et al. 2015).

Cependant, les analyses EDX réalisées n'ont pas permis pour le moment d'identifier des caractéristiques ou des éléments traces permettant de différencier en MET les agrégats de carbones issues de la fumée de tabac des autres types d'agrégats de carbone par exemple liés à la pollution atmosphérique (particules diesel).

3.4. Conclusions

Les analyses préliminaires réalisées ne permettent pas de définir des critères morphologiques ou des caractéristiques en spectrométrie EDX permettant de différencier des particules de carbone liées à la consommation de tabac de celles liées à la pollution atmosphérique.

Cependant, il est nécessaire de confirmer ces données avec un échantillonnage plus important et sur d'autres types ou marques de tabac.

Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de mettre au point une méthode permettant l'analyse des particules de taille nanométrique dans les tissus et fluides biologiques humains et de l'appliquer dans deux études afin d'obtenir les premières données humaines sur la translocation pleurale et placentaire de ces particules.

1. Synthèse des résultats obtenus

Une revue de la littérature a permis d'une part d'identifier les attentes des cliniciens auxquelles devrait répondre une méthode de biométrie des NP. Elle a également permis d'identifier les techniques d'analyse qui pourraient être utilisées dans ce but parmi celles utilisées en nanotoxicologie ou dans le cadre de la recherche liée à la fabrication et l'utilisation des nanoparticules. Le choix de la microscopie électronique à transmission a été guidé par les nombreux avantages qu'elle représente :

- résolution importante adaptée à l'étude de nanoparticules,
- relative disponibilité pour les cliniciens dans les centres hospitalo-universitaires,
- obtention de données aussi bien sur les caractéristiques physiques (taille, degré d'agrégation) que chimiques (composition élémentaire obtenue par analyse EDX).

Ces avantages expliquent que cette méthode soit utilisée pour rechercher et caractériser les nanoparticules dans les tissus ou fluides biologiques dans les quelques rapports de cas existant dans la littérature. Cela explique également que ce soit la technique de référence pour les méthodes de biométrie des particules minérales fibreuses (amiante) ou non fibreuses (silice, particules métalliques...) de taille micronique. En revanche cette méthode n'a pas fait l'objet de réflexion et encore moins de systématisation pour quantifier les particules nanométriques manufacturées ou non intentionnelles.

Concevoir un protocole de préparation et d'analyse en microscopie électronique adapté aux NP a donc été la première étape de ce travail. Les nombreux tests réalisés ont permis d'obtenir notamment les améliorations suivantes :

- pour la préparation des échantillons:
 - gain de temps (réduction du temps de filtration d'environ un tiers),
 - standardisation de la méthode (volume de réactifs utilisé constant permettant de contrôler les sources de contamination donc le bruit de fond),
 - adaptation de la technique de préparation à d'autres types d'échantillons que le parenchyme pulmonaire et le liquide de lavage broncho-alvéolaire,
 - amélioration de la qualité des grilles pour les rendre compatibles avec un travail à fort grossissement.
- pour l'analyse en microscopie électronique :
 - réduction du temps de microscopie nécessaire,
 - création d'une méthode d'analyse permettant d'obtenir des indicateurs importants pour l'étude quantitative des NP (indicateurs morphologiques, surface développée).

Ces améliorations ont permis la mise au point d'une méthode de biométrie adaptée au NP dont la faisabilité et l'intérêt ont été étudiés dans le cadre de deux applications.

La première étude a permis de confirmer les résultats des études expérimentales chez l'animal et des études de perfusion de placentas humains ex-vivo tendant à démontrer que des particules exogènes présentes dans la circulation sanguine maternelle étaient capables de traverser le placenta et de s'accumuler dans les tissus fœtaux. Notre méthode permettant d'obtenir des données quantitatives (concentration numérique ou surface développée), nous a permis pour la première fois de démontrer une corrélation entre rétention pulmonaire fœtale et données d'exposition maternelle (exposition aux particules de la fumée de tabac).

La deuxième étude s'est intéressée à la translocation régionale thoracique des particules fines et ultrafines. Elle a permis de démontrer chez l'homme que les particules fines et ultrafines non fibreuses peuvent se concentrer dans la plèvre pariétale comme cela était suspecté à partir de travaux antérieurs sur l'animal (particules nanométriques et fibres) ou chez l'homme (fibres). Nous avons démontré que ces particules se concentrent préférentiellement dans les « black spots » à des concentrations similaires ou supérieures aux concentrations pulmonaires. L'analyse en EDX des particules a permis de retrouver des similitudes en termes de

composition chimique entre les particules pleurales et pulmonaires, ce qui, compte tenu des données actuelles de la littérature sur la physiologie pleurale et la clairance lymphatique pleurale et pulmonaire, suggère une translocation régionale via l'espace pleural. Contrairement à la première étude sur les échantillons foetaux dans laquelle la majorité des particules était des agrégats de PUF métalliques, les particules retrouvées dans le poumon et la plèvre étaient principalement des particules ultrafines de carbone issues de la combustion.

Dans le cadre de ces deux études, nous nous sommes heurtés à des questions liées à l'interprétation des observations réalisées en microscopie électronique. Ces questions ont fait l'objet de discussions lors de réunions d'un groupe de travail réunissant des chercheurs ou des techniciens spécialisés dans la caractérisation de particules de tailles nanométriques dans l'air ou les tissus humains et étaient principalement de deux ordres :

- Quel est le degré de variabilité inter opérateur sur ce type de méthode et les possibilités d'y remédier ?
- Est-il possible de relier les particules observées dans les échantillons à des sources d'exposition environnementales et professionnelles?

Les tests réalisés ont montré une variabilité non négligeable sur le classement des particules en fonction de leur aspect ou de leur composition chimique. Afin de répondre à cette préoccupation, les critères de classement ont été revus et simplifiés par consensus et un portfolio des particules observées et leurs spectres EDX a été créé afin de servir de support aux futures observations en MET.

Afin de répondre à la deuxième question, une veille active de la littérature a été effectuée afin de recueillir des données sur l'analyse de PUF dans l'air en microscopie électronique à transmission et en spectrométrie EDX. Ces données étant relativement peu nombreuses notamment pour le tabac, il nous a semblé intéressant de compléter les analyses d'échantillons biologiques par une étude des émissions de particules ultrafines par un procédé de travail potentiellement émissif et une étude des particules contenues dans la fumée de tabac.

L'étude de l'exposition des travailleurs aux particules fines et ultrafines dans le cadre de chantiers de meulage de rail a permis de démontrer que les expositions principales des

travailleurs étaient liées aux particules ultrafines émises par les moteurs diesel et non à des particules métalliques émises lors du meulage comme cela était suspecté. Elle a permis d'améliorer les connaissances sur l'aspect et la composition chimique des particules ultrafines émises par des moteurs diesel et de retrouver des similitudes avec les particules ultrafines de carbone déjà retrouvées dans les échantillons biologiques.

L'étude préliminaire des émissions de particules lors de la combustion de tabac n'a pas permis de retrouver des caractéristiques physicochimiques permettant de différencier en microscopie électronique ces particules carbonées de celles issues d'autres sources de combustion.

2. Limites de la méthode d'analyse et des études réalisées

La phase de mise au point de la méthode a permis de mettre en évidence, d'évaluer voire de réduire certaines limites méthodologiques :

- les possibilités de contamination liée aux réactifs. En effet, quels que soient les réactifs analysés, on ne peut totalement éliminer la présence de nanoparticules générant un bruit de fond qui peut gêner l'analyse de tissus dans lesquels la concentration en particules attendue est faible (tissus autres que le parenchyme pulmonaire ou les organes lymphatiques). Pour cette raison, dans les deux études, des blancs ont été réalisés sur les réactifs et pour chaque digestion d'échantillons afin de prendre en compte ce bruit de fond dans les analyses statistiques lorsque cela était nécessaire,
- les possibilités de pertes en particules individuelles lors de la préparation par digestion/filtration. Les données de la littérature indiquent que les particules individuelles ont tendance à s'agglomérer rapidement après leur émission dans l'air mais également lors de leur déposition pulmonaire et qu'elles représentent donc une fraction minoritaire par rapport aux agrégats. Il reste que les pertes de particules individuelles dont le diamètre est inférieur à celui des pores de filtration peuvent induire un biais de sous-estimation que nous n'avons pas réussi à résoudre sur le plan méthodologique par l'utilisation de l'ultracentrifugation.

- enfin l'analyse en MET ne se prête pas à une analyse des particules de moins de 10 nm ni à l'analyse de particules qui ne seraient pas stables sous le faisceau des électrons ce qui peut également être une source de sous-estimation.

L'application de la méthode dans le cadre de l'étude sur la rétention foetale et de l'étude sur la rétention pulmonaire et pleurale chez l'adulte ont également les limites suivantes:

- la petite taille des effectifs analysés qui induit une faible puissance statistique ce qui devra être pris en compte dans les éventuelles études ultérieures,
- l'absence d'analyse en microscopie électronique de coupe de tissus qui permettrait de confirmer que les particules sont bien issues des tissus analysés et non des réactifs. Cette analyse serait possible et pertinente pour les tissus riches en particules (black spot, parenchyme pulmonaire) et pourrait être intégrée dans des études ultérieures. En revanche, pour les autres tissus, compte tenu de la faible probabilité de rencontrer ces particules, le temps de microscopie nécessaire serait démesuré. De plus, il serait très difficile de repérer ces particules parmi les structures cellulaires surtout si ce sont des particules individuelles ou si on s'intéresse aux particules carbonées,
- un manque de précision sur les données d'exposition des patients chez lesquels les particules ont été retrouvées ce qui a déjà été discuté de façon détaillé dans les parties consacrées à ces études,
- la nécessité de confirmer les résultats obtenus sur des échantillons plus représentatifs d'un état physiologique. Ce serait possible dans une nouvelle étude sur une série autopsique adulte mais paraît impossible pour une étude sur la rétention foetale,
- les limites liées à la conservation des échantillons. En effet pour l'étude sur la rétention pleurale, les risques de contamination ont été accrus du fait de la conservation prolongée des échantillons dans le formol et il est également possible que certaines particules aient été dissoutes durant cette conservation. Cependant, cela ne remet pas en cause les résultats obtenus, notamment lorsqu'ils sont le fruit d'une comparaison entre zone saine et anthracosique prélevées sur le même échantillon de plèvre donc avec des conditions de conservation identiques,

3. Perspectives

Ce travail a donc permis de mettre au point une méthode de préparation et d'analyse permettant de poser les premières bases de la biométrie des PUF. L'application de cette méthode dans le cadre de deux études a permis de démontrer son intérêt et sa faisabilité dans le cadre de projets de recherche.

Les améliorations apportées à la méthode de digestion et l'utilisation de filtrations des échantillons en série ont permis de réduire d'un facteur 4 à 5 le temps matériel et humain nécessaires, donc le coût. Cependant, le temps nécessaire à l'analyse en MET reste un facteur limitant pour la conception de nouveaux protocoles de recherche ou pour la réutilisation de la technique dans un but de biométrie des particules nanométriques en routine par exemple pour le diagnostic étiologique de pathologies pulmonaires après exposition à des NP manufacturées ou à des PUF ou pour le suivi de travailleurs exposés.

Des améliorations pourraient être envisagées pour optimiser ce temps comme par exemple l'automatisation de l'étape de prise d'images au hasard ou l'optimisation de l'analyse d'image par des techniques de seuillage. Ces techniques permettent à partir d'une image en niveau de gris, de créer une image comportant uniquement deux valeurs, noir ou blanc ce qui permet, avec les logiciels de traitement d'image tels que Image J, d'automatiser le comptage et le mesurage des particules en une étape qui prendrait moins d'une heure par échantillon au lieu de 4 à 6 h. La mise en œuvre de telles techniques nécessite cependant de réduire autant que possible les artefacts qui pourraient être dus à des résidus de digestion ou à l'évaporation de carbone.

Ces améliorations permettraient de réduire le temps humain et matériel nécessaire à l'analyse des échantillons et de pouvoir envisager des études sur des séries plus importantes. Ces études pourraient permettre de répondre à certaines questions restant en suspens telles que :

- quelles sont les valeurs de référence de la rétention des tissus et fluides biologiques (liquide de lavage broncho-alvéolaire, condensat d'air exhalé, organes périphériques tels que le système nerveux central) chez les individus sans exposition professionnelle et non fumeurs ?
- existe t-il une corrélation entre les données de rétention pulmonaire (niveaux de concentration et composition chimique des particules) et les données d'exposition

professionnelles actuelles et passées ? (Ces données pourraient être obtenues par l'analyse d'échantillons provenant de groupes de patients ayant une exposition professionnelle homogène),

- existe t-il une corrélation entre des résultats qui seraient obtenus en microscopie électronique et d'autres méthodes analytiques telles que les méthodes d'analyse élémentaire (par ICP/AES, ICP/MS ou mieux, par single particle ICP/MS) ?
- existe t-il une corrélation entre la présence de particules nanométriques dans des échantillons obtenus de façon non invasive (condensats d'air exhalé) et des marqueurs de l'inflammation ?
- quelle est la cinétique réelle des particules nanométriques inhalées dans le cadre d'expositions contrôlées ou dans le cadre d'expositions professionnelles ?

Bibliographie

- Abid, A. D., D. S. Anderson, G. K. Das, L. S. Van Winkle, and I. M. Kennedy. 2013. 'Novel lanthanide-labeled metal oxide nanoparticles improve the measurement of in vivo clearance and translocation', *Part Fibre Toxicol*, 10: 1.
- AFNOR. 1995. "Air des lieux de travail - Échantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques." In. Paris.
- . 1996. "Qualité de l'air - détermination de la concentration en fibres d'amiante par microscopie électronique à transmission." In, edited by Association française de normalisation, 44. Paris.
- . 2002. "Air des lieux de travail - Prélèvement et dosage d'aldéhydes." In. Paris.
- . 2004. "Air des lieux de travail. Prélèvement et analyse de gaz et vapeurs organiques. Prélèvement par pompage sur tube à adsorption et désorption par solvant." In.
- . 2005. "Air des lieux de travail - Détermination des métaux et métalloïdes dans les particules en suspension dans l'air par spectrométrie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif." In.
- Agostoni, E., and L. Zocchi. 2007. 'Pleural liquid and its exchanges', *Respir Physiol Neurobiol*, 159: 311-23.
- AIRAQ. 2010. 'Report ET/PE/14/03 : Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en Aquitaine', AIRAQ, Accessed 04.05.2015. http://www.airaq.asso.fr/fileadmin/user_upload/redacteur/Inventaire_emissions_Aquitaine_2010_V2.0.pdf.
- Ajab, H., A. Yaqub, S. A. Malik, M. Junaid, S. Yasmeen, and M. A. Abdullah. 2014. 'Characterization of toxic metals in tobacco, tobacco smoke, and cigarette ash from selected imported and local brands in Pakistan', *ScientificWorldJournal*, 2014: 413614.
- Al Faraj, A., K. Cieslar, G. Lacroix, S. Gaillard, E. Canet-Soulas, and Y. Cremillieux. 2009. 'In vivo imaging of carbon nanotube biodistribution using magnetic resonance imaging', *Nano Lett*, 9: 1023-7.
- Ali, J., M. Ali, S. Baboota, J. K. Sahani, C. Ramassamy, L. Dao, and Bhavna. 2010. 'Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration', *Curr Pharm Des*, 16: 1644-53.
- Almeida, J. P., A. L. Chen, A. Foster, and R. Drezek. 2011. 'In vivo biodistribution of nanoparticles', *Nanomedicine (Lond)*, 6: 815-35.
- Anderson, P. J., J. D. Wilson, and F. C. Hiller. 1989. 'Particle size distribution of mainstream tobacco and marijuana smoke. Analysis using the electrical aerosol analyzer', *Am Rev Respir Dis*, 140: 202-5.
- Andujar, P., S. Lanone, P. Brochard, and J. Boczkowski. 2011. 'Respiratory effects of manufactured nanoparticles', *Rev Mal Respir*, 28: e66-75.
- ANSES. 2015. "Pollution chimique de l'air des enceintes de transports ferroviaires souterrains et risques sanitaires associés chez les travailleurs." In *Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective*, 361. Paris, France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

- Arvizo, R., R. Bhattacharya, and P. Mukherjee. 2010. 'Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine', *Expert Opin Drug Deliv*, 7: 753-63.
- Auerbach, O., A. S. Conston, L. Garfinkel, V. R. Parks, H. D. Kaslow, and E. C. Hammond. 1980. 'Presence of asbestos bodies in organs other than the lung', *Chest*, 77: 133-7.
- Backes, C. H., T. Nelin, M. W. Gorr, and L. E. Wold. 2013. 'Early life exposure to air pollution: how bad is it?', *Toxicol Lett*, 216: 47-53.
- Baek, M., H. E. Chung, J. Yu, J. A. Lee, T. H. Kim, J. M. Oh, W. J. Lee, S. M. Paek, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Choy, and S. J. Choi. 2012. 'Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles', *Int J Nanomedicine*, 7: 3081-97.
- Bakand, S., A. Hayes, and F. Dechskulthorn. 2012. 'Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure', *Inhal Toxicol*, 24: 125-35.
- Baker, R. R., and M. Dixon. 2006. 'The retention of tobacco smoke constituents in the human respiratory tract', *Inhal Toxicol*, 18: 255-94.
- Balansky, R., M. Longobardi, G. Ganchev, M. Iltcheva, N. Nedyalkov, P. Atanasov, R. Toshkova, S. De Flora, and A. Izzotti. 2013. 'Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice', *Mutat Res*, 751-752: 42-8.
- Balasubramanian, S. K., J. Jittiwat, J. Manikandan, C. N. Ong, L. E. Yu, and W. Y. Ong. 2010. 'Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats', *Biomaterials*, 31: 2034-42.
- Barton, H. A., V. J. Cogliano, L. Flowers, L. Valcovic, R. W. Setzer, and T. J. Woodruff. 2005. 'Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens', *Environ Health Perspect*, 113: 1125-33.
- Benbrahim-Tallaa, L., R. A. Baan, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, N. Guha, D. Loomis, K. Straif, and Group International Agency for Research on Cancer Monograph Working. 2012. 'Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes', *Lancet Oncol*, 13: 663-4.
- Bernaudin, J. F., and J. Fleury-Feith. 2006. '[Structure and physiology of the pleura and the pleural space]', *Rev Pneumol Clin*, 62: 73-7.
- Bernhard, D., A. Rossmann, and G. Wick. 2005. 'Metals in cigarette smoke', *IUBMB Life*, 57: 805-9.
- Bernstein, D. M., K. Donaldson, U. Decker, S. Gaering, P. Kunzendorf, J. Chevalier, and S. E. Holm. 2008. 'A biopersistence study following exposure to chrysotile asbestos alone or in combination with fine particles', *Inhal Toxicol*, 20: 1009-28.
- Bernstein, D. M., R. A. Rogers, R. Sepulveda, K. Donaldson, D. Schuler, S. Gaering, P. Kunzendorf, J. Chevalier, and S. E. Holm. 2011. 'Quantification of the pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite-asbestos following short-term inhalation exposure', *Inhal Toxicol*, 23: 372-91.
- Blum, J. L., J. Q. Xiong, C. Hoffman, and J. T. Zelikoff. 2012. 'Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth', *Toxicol Sci*, 126: 478-86.
- Bodenhofer, U., and F. Klawonn. 2008. 'Robust rank correlation coefficients on the basis of fuzzy orderings: Initial steps', *Mathware & Soft Computing*, 15: 5-20.
- Bodenhofer, U., and M. Krone. 2013. 'RoCoCo: An R package implementing a robust rank correlation coefficient and a corresponding test', Institute of Bioinformatics, Johannes Kepler University <http://cran.r-project.org/web/packages/rococo/vignettes/rococo.pdf>.

- Boffetta, P., and D. T. Silverman. 2001. 'A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure', *Epidemiology*, 12: 125-30.
- Bonner, J. C. 2010. 'Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease', *Proc Am Thorac Soc*, 7: 138-41.
- Boutin, C., P. Dumortier, F. Rey, J. R. Viallat, and P. De Vuyst. 1996. 'Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study', *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 444-9.
- Boyes, W. K., R. Chen, C. Chen, and R. A. Yokel. 2012. 'The neurotoxic potential of engineered nanomaterials', *Neurotoxicology*, 33: 902-10.
- Brauer, M., C. Avila-Casado, T. I. Fortoul, S. Vedal, B. Stevens, and A. Churg. 2001. 'Air pollution and retained particles in the lung', *Environ Health Perspect*, 109: 1039-43.
- Brinkman, M. C., J. C. Chuang, S. M. Gordon, H. Kim, R. R. Kroeger, G. M. Polzin, and P. A. Richter. 2012. 'Exposure to and deposition of fine and ultrafine particles in smokers of menthol and nonmenthol cigarettes', *Inhal Toxicol*, 24: 255-69.
- Broadus, V. C., J. I. Everitt, B. Black, and A. B. Kane. 2011. 'Non-neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure', *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 14: 153-78.
- Brodway, DM, and R. Rosenzweig. 2011. 'Deposition of fractal-like soot aggregates in the human respiratory tract', *Journal of Aerosol Science*, 42: 372-86.
- Brouwer, D. H., J. H. Gijbbers, and M. W. Lurvink. 2004. 'Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies', *Ann Occup Hyg*, 48: 439-53.
- Brown, J. S., W. E. Wilson, and L. D. Grant. 2005. 'Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans', *Inhal Toxicol*, 17: 355-85.
- Brown, J. S., K. L. Zeman, and W. D. Bennett. 2002. 'Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung', *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1240-7.
- Buerki-Thurnherr, T., U. von Mandach, and P. Wick. 2012. 'Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier', *Swiss Med Wkly*, 142: w13559.
- Bunn, H. J., D. Dinsdale, T. Smith, and J. Grigg. 2001. 'Ultrafine particles in alveolar macrophages from normal children', *Thorax*, 56: 932-4.
- Burns, A. A., J. Vider, H. Ow, E. Herz, O. Penate-Medina, M. Baumgart, S. M. Larson, U. Wiesner, and M. Bradbury. 2009. 'Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine', *Nano Lett*, 9: 442-8.
- Campagnolo, L., M. Massimiani, G. Palmieri, R. Bernardini, C. Sacchetti, A. Bergamaschi, L. Vecchione, A. Magrini, M. Bottini, and A. Pietrojusti. 2013. 'Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice', *Part Fibre Toxicol*, 10: 21.
- Card, J. W., D. C. Zeldin, J. C. Bonner, and E. R. Nestmann. 2008. 'Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295: L400-11.
- Carvalho, T. C., J. I. Peters, and R. O. Williams, 3rd. 2011. 'Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there?', *Int J Pharm*, 406: 1-10.

- Cena, L. G., W. P. Chisholm, M. J. Keane, and B. T. Chen. 2015. 'A Field Study on the Respiratory Deposition of the Nano-Sized Fraction of Mild and Stainless Steel Welding Fume Metals', *J Occup Environ Hyg*, 12: 721-8.
- Cena, L. G., M. J. Keane, W. P. Chisholm, S. Stone, M. Harper, and B. T. Chen. 2014. 'A novel method for assessing respiratory deposition of welding fume nanoparticles', *J Occup Environ Hyg*, 11: 771-80.
- Cho, W. S., B. C. Kang, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Che, and S. H. Seok. 2013. 'Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration', *Part Fibre Toxicol*, 10: 9.
- Choi, H. S., Y. Ashitate, J. H. Lee, S. H. Kim, A. Matsui, N. Insin, M. G. Bawendi, M. Semmler-Behnke, J. V. Frangioni, and A. Tsuda. 2010. 'Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body', *Nat Biotechnol*, 28: 1300-3.
- Choi, H. S., W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi, and J. V. Frangioni. 2007. 'Renal clearance of quantum dots', *Nat Biotechnol*, 25: 1165-70.
- Chu, M., Q. Wu, H. Yang, R. Yuan, S. Hou, Y. Yang, Y. Zou, S. Xu, K. Xu, A. Ji, and L. Sheng. 2010. 'Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier', *Small*, 6: 670-8.
- Churg, A., and M. Brauer. 1997. 'Human lung parenchyma retains PM2.5', *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 2109-11.
- . 2000. 'Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs', *Ultrastruct Pathol*, 24: 353-61.
- Creutzenberg, O., B. Bellmann, R. Korolewitz, W. Koch, I. Mangelsdorf, T. Tillmann, and D. Schaudien. 2012. 'Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles in vivo following lung exposure in rats', *Inhal Toxicol*, 24: 821-30.
- Cui, Y., X. Chen, Z. Zhou, Y. Lei, M. Ma, R. Cao, T. Sun, J. Xu, M. Huo, R. Cao, C. Wen, and Y. Che. 2014. 'Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats', *Chemosphere*, 96: 99-104.
- Curwin, B., and S. Bertke. 2011. 'Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace', *J Occup Environ Hyg*, 8: 580-7.
- Daher, N., R. Saleh, E. Jaroudi, H. Sheheitli, T. Badr, E. Sepetdjian, M. Al Rashidi, N. Saliba, and A. Shihadeh. 2010. 'Comparison of carcinogen, carbon monoxide, and ultrafine particle emissions from narghile waterpipe and cigarette smoking: Sidestream smoke measurements and assessment of second-hand smoke emission factors', *Atmos Environ (1994)*, 44: 8-14.
- De Jong, W. H., W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips, and R. E. Geertsma. 2008. 'Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration', *Biomaterials*, 29: 1912-9.
- De Vuyst, P. 1997. '[Physiopathology of pleural diseases]', *Rev Prat*, 47: 1294-7.
- Decologne, N., G. Wettstein, M. Kolb, P. Margetts, C. Garrido, P. Camus, and P. Bonniaud. 2010. 'Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles', *Eur Respir J*, 35: 176-85.
- Deering, C. E., S. Tadjiki, S. Assemi, J. D. Miller, G. S. Yost, and J. M. Veranth. 2008. 'A novel method to detect unlabeled inorganic nanoparticles and submicron particles in tissue by sedimentation field-flow fractionation', *Part Fibre Toxicol*, 5: 18.
- Delcourt, J., and JP Sandino. 2000. 'Evaluation des performances du badge GABIE® dans des atmosphères industrielles. Etude de cas', *Hygiène et sécurité du travail*, 181: 12.

- Demou, E., P. Peter, and S. Hellweg. 2008. 'Exposure to manufactured nanostructured particles in an industrial pilot plant', *Ann Occup Hyg*, 52: 695-706.
- Demou, E., W. J. Stark, and S. Hellweg. 2009. 'Particle emission and exposure during nanoparticle synthesis in research laboratories', *Ann Occup Hyg*, 53: 829-38.
- Deng, X, G Jia, H Wang, H Sun, X Wang, S Yang, T Wang, and Y Liu. 2007. ' Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo', *Carbon*, 45.
- Di Bona, K. R., Y. Xu, P. A. Ramirez, J. DeLaine, C. Parker, Y. Bao, and J. F. Rasco. 2014. 'Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice', *Reprod Toxicol*, 50: 36-42.
- Dodson, R. F., and M. A. Atkinson. 2006. 'Measurements of asbestos burden in tissues', *Ann NY Acad Sci*, 1076: 281-91.
- Donaldson, K, G Oberdörster, G Ichihara, AD Maynard, F Marano, H Wallin, C Lang Tran, V Stone, S Hermann, S Loft, and PJA Borm. 2009. 'Nanoparticles - one word: A multiplicity of different hazards.', *Nanotoxicology*, 3: 263-64.
- Donaldson, K., F. A. Murphy, R. Duffin, and C. A. Poland. 2010. 'Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma', *Part Fibre Toxicol*, 7: 5.
- Donaldson, K., C. A. Poland, F. A. Murphy, M. MacFarlane, T. Chernova, and A. Schinwald. 2013. 'Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences', *Adv Drug Deliv Rev*, 65: 2078-86.
- Donaldson, K., L. Tran, L. A. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee, and V. Stone. 2005. 'Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure', *Part Fibre Toxicol*, 2: 10.
- Dumortier, P., F. Rey, J. R. Viallat, I. Broucke, C. Boutin, and P. De Vuyst. 2002. 'Chrysotile and tremolite asbestos fibres in the lungs and parietal pleura of Corsican goats', *Occup Environ Med*, 59: 643-6.
- Dziendzikowska, K., J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, M. Oczkowski, A. Krawczynska, J. Chwastowska, M. Sadowska-Bratek, E. Chajduk, M. Wojewodzka, M. Dusinska, and M. Kruszewski. 2012. 'Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats', *J Appl Toxicol*, 32: 920-8.
- Egashira, R., T. Tanaka, T. Imaizumi, K. Senda, Y. Doki, S. Kudo, and J. Fukuoka. 2013. 'Differential distribution of lymphatic clearance between upper and lower regions of the lung', *Respirology*, 18: 348-53.
- El-Sayed, Y. S., R. Shimizu, A. Onoda, K. Takeda, and M. Umezawa. 2015. 'Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice', *Toxicology*, 327: 53-61.
- Elder, A., R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter, R. Potter, A. Maynard, Y. Ito, J. Finkelstein, and G. Oberdorster. 2006. 'Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system', *Environ Health Perspect*, 114: 1172-8.
- Elihn, K., and P. Berg. 2009. 'Ultrafine particle characteristics in seven industrial plants', *Ann Occup Hyg*, 53: 475-84.

- Ema, M., N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, and J. Nakanishi. 2010. 'Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials', *Reprod Toxicol*, 30: 343-52.
- Ema, M., M. Naya, M. Horimoto, and H. Kato. 2013. 'Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals', *Reprod Toxicol*, 42: 1-17.
- EU. 2011. "Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance." In, edited by European Commission. Brussels.
- Eydner, M., D. Schaudien, O. Creutzenberg, H. Ernst, T. Hansen, W. Baumgartner, and S. Rittinghausen. 2012. 'Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index', *Inhal Toxicol*, 24: 557-69.
- Ferin, J., G. Oberdorster, and D. P. Penney. 1992. 'Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6: 535-42.
- Fleury Feith, J., and M. C. Jaurand. 2013. '[Pleural lymphatics and pleural diseases related to fibres]', *Rev Pneumol Clin*, 69: 358-62.
- Florence, A. T., A. M. Hillery, N. Hussain, and P. U. Jani. 1995. 'Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence', *J Drug Target*, 3: 65-70.
- Frohlich, E., and E. Roblegg. 2012. 'Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products', *Toxicology*, 291: 10-7.
- Furuyama, A., S. Kanno, T. Kobayashi, and S. Hirano. 2009. 'Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes', *Arch Toxicol*, 83: 429-37.
- Garnett, M. C., and P. Kallinteri. 2006. 'Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles', *Occup Med (Lond)*, 56: 307-11.
- Gatti, A. M., P. Bosco, F. Rivasi, S. Bianca, G. Ettore, L. Gaetti, S. Montanari, G. Bartoloni, and D. Gazzolo. 2011. 'Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues', *Front Biosci (Elite Ed)*, 3: 221-6.
- Gatti, A. M., S. Montanari, E. Monari, A. Gambarelli, F. Capitani, and B. Parisini. 2004. 'Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood', *J Mater Sci Mater Med*, 15: 469-72.
- Geiser, M., and W. G. Kreyling. 2010. 'Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles', *Part Fibre Toxicol*, 7: 2.
- Geraets, L., A. G. Oomen, J. D. Schroeter, V. A. Coleman, and F. R. Cassee. 2012. 'Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study', *Toxicol Sci*, 127: 463-73.
- Ghaderi, S., S. R. Tabatabaei, H. N. Varzi, and M. Rashno. 2015. 'Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice', *J Toxicol Sci*, 40: 263-75.
- Gomes, J. F., P. C. Albuquerque, R. M. Miranda, and M. T. Vieira. 2012. 'Determination of airborne nanoparticles from welding operations', *J Toxicol Environ Health A*, 75: 747-55.
- Gomes, J. F., R. M. Miranda, T. J. Santos, and P. A. Carvalho. 2014. 'Emission of nanoparticles during friction stir welding (FSW) of aluminium alloys', *J Toxicol Environ Health A*, 77: 924-30.

- Grafmueller, S., P. Manser, L. Diener, P. A. Diener, X. Maeder-Althaus, L. Maurizi, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach, and P. Wick. 2015. 'Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an Human Placental Perfusion Model', *Environ Health Perspect*.
- Gray, E. P., J. G. Coleman, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, J. F. Ranville, and C. P. Higgins. 2013. 'Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry', *Environ Sci Technol*, 47: 14315-23.
- Gu, J., U. Kraus, A. Schneider, R. Hampel, M. Pitz, S. Breitner, K. Wolf, O. Hanninen, A. Peters, and J. Cyrus. 2015. 'Personal day-time exposure to ultrafine particles in different microenvironments', *Int J Hyg Environ Health*, 218: 188-95.
- Guo, J., T. Kauppinen, P. Kyyronen, P. Heikkila, M. L. Lindbohm, and E. Pukkala. 2004. 'Risk of esophageal, ovarian, testicular, kidney and bladder cancers and leukemia among finnish workers exposed to diesel or gasoline engine exhaust', *Int J Cancer*, 111: 286-92.
- Hagens, W. I., A. G. Oomen, W. H. de Jong, F. R. Cassee, and A. J. Sips. 2007. 'What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?', *Regul Toxicol Pharmacol*, 49: 217-29.
- Haque, A. K., D. M. Vrazel, and T. Uchida. 1998. 'Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas', *Arch Environ Contam Toxicol*, 35: 532-8.
- Hart, J. E., F. Laden, M. B. Schenker, and E. Garshick. 2006. 'Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers', *Environ Health Perspect*, 114: 1013-7.
- Hauser, R., J. J. Godleski, V. Hatch, and D. C. Christiani. 2001. 'Ultrafine particles in human lung macrophages', *Arch Environ Health*, 56: 150-6.
- He, X., T. Reponen, R. McKay, and S. A. Grinshpun. 2014. 'How does breathing frequency affect the performance of an N95 filtering facepiece respirator and a surgical mask against surrogates of viral particles?', *J Occup Environ Hyg*, 11: 178-85.
- He, X., H. Zhang, Y. Ma, W. Bai, Z. Zhang, K. Lu, Y. Ding, Y. Zhao, and Z. Chai. 2010. 'Lung deposition and extrapulmonary translocation of nano-ceria after intratracheal instillation', *Nanotechnology*, 21: 285103.
- HEI. 2013. "HEI Review Panel on Ultrafine Particles." In *Understanding the Health Effects of Ambient Ultrafine Particles*, 122. Boston, MA: Health Effects Institute.
- Hiller, F. C., P. J. Anderson, and M. K. Mazumder. 1987. 'Deposition of sidestream cigarette smoke in the human respiratory tract. II. Deposition of ultrafine smoke particles', *Toxicol Lett*, 35: 95-9.
- Hillyer, J. F., and R. M. Albrecht. 2001. 'Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles', *J Pharm Sci*, 90: 1927-36.
- Hirst, S. M., A. Karakoti, S. Singh, W. Self, R. Tyler, S. Seal, and C. M. Reilly. 2013. 'Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice', *Environ Toxicol*, 28: 107-18.
- Hong, J. S., M. K. Park, M. S. Kim, J. H. Lim, G. J. Park, E. H. Maeng, J. H. Shin, M. K. Kim, J. Jeong, J. A. Park, J. C. Kim, and H. C. Shin. 2014. 'Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats', *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 2: 159-71.

- Hougaard, K.S., B. Fadeel, M. Gulumian, V.E. Kagan, and K. Savolainen. 2011. 'Developmental toxicity of engineered nanoparticles.' in RC Gupta (ed.), *Reproductive and developmental toxicology* (Academic Press: Amsterdam).
- Hull, M. J., and J. L. Abraham. 2002. 'Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis', *Hum Pathol*, 33: 819-25.
- Hunt, A., J. L. Abraham, B. Judson, and C. L. Berry. 2003. 'Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues', *Environ Health Perspect*, 111: 1209-14.
- Hussain, S., J. A. Vanoirbeek, S. Haenen, V. Haufroid, S. Boland, F. Marano, B. Nemery, and P. H. Hoet. 2013. 'Prior lung inflammation impacts on body distribution of gold nanoparticles', *Biomed Res Int*, 2013: 923475.
- IARC. 2012. "Diesel engine exhaust carcinogenic." In.
- INRS. 2007. 'Particules émises par des moteurs diesel', INRS édition, Accessed April the 9th. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/\\$File/038.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/$File/038.pdf).
- . 2012. *Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France* (Edition INRS: Paris).
- . 2013. 'Amiante par microscopie électronique à transmission, Fiche Metropol 010V02.02', INRS. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/D8D01F81566F2A39C1256D5C0041E58A/\\$File/010.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/D8D01F81566F2A39C1256D5C0041E58A/$File/010.pdf)
- Ishimatsu, S., T. Oyabu, H. Hori, and I. Tanaka. 1999. 'A new digestion method for recovery of MMMFs from lungs', *Ind Health*, 37: 307-12.
- ISO. 2007. "Workplace atmospheres Ultrafine. nanoparticle and nano-structured aerosols. Inhalation exposure characterization and assessment." In *ISO/TR 27628:2007*, edited by International Organization for Standardization, 28. Geneva.
- Jackson, P., K. S. Hougaard, A. M. Boisen, N. R. Jacobsen, K. A. Jensen, P. Moller, G. Brunborg, K. B. Gutzkow, O. Andersen, S. Loft, U. Vogel, and H. Wallin. 2012. 'Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring', *Nanotoxicology*, 6: 486-500.
- Jackson, P., U. Vogel, H. Wallin, and K. S. Hougaard. 2011. 'Prenatal exposure to carbon black (printex 90): effects on sexual development and neurofunction', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 109: 434-7.
- Jani, P., G. W. Halbert, J. Langridge, and A. T. Florence. 1990. 'Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency', *J Pharm Pharmacol*, 42: 821-6.
- Ji, X. 2010. 'Évaluation des expositions humaines aux particules ultrafines', Université Paris-Est École doctorale ABIES.
- Ji, X., O. Le Bihan, O. Ramalho, C. Mandin, B. D'Anna, L. Martinon, M. Nicolas, D. Bard, and J. C. Paireon. 2010. 'Characterization of particles emitted by incense burning in an experimental house', *Indoor Air*, 20: 147-58.
- Jo, E., G. Seo, J. T. Kwon, M. Lee, Bc Lee, I. Eom, P. Kim, and K. Choi. 2013. 'Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats', *J Toxicol Sci*, 38: 525-30.

- Juch, H., L. Nikitina, P. Debbage, G. Dohr, and M. Gauster. 2013. 'Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues', *Reprod Toxicol*, 41: 73-9.
- Kalappanavar, N. K., C. S. Vinodkumar, C. Gouli, D. Sanjay, K. Nagendra, K. G. Basavarajappa, and R. Patil. 2012. 'Carbon particles in airway macrophage as a surrogate marker in the early detection of lung diseases', *Int J Occup Environ Med*, 3: 68-75.
- Kane, A. B. 2006. 'Animal models of malignant mesothelioma', *Inhal Toxicol*, 18: 1001-4.
- Kannan, S., D. P. Misra, J. T. Dvorchak, and A. Krishnakumar. 2006. 'Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition', *Environ Health Perspect*, 114: 1636-42.
- Kao, Y. Y., T. J. Cheng, D. M. Yang, C. T. Wang, Y. M. Chiung, and P. S. Liu. 2012. 'Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo', *J Mol Neurosci*, 48: 464-71.
- Kaufman, J., and S. Hastings. 2005. 'Respiratory demand during rigorous physical work in a chemical protective ensemble', *J Occup Environ Hyg*, 2: 98-110.
- Kendall, M., and S. Holgate. 2012. 'Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung', *Respirology*, 17: 743-58.
- Kettiger, H., A. Schipanski, P. Wick, and J. Huwyler. 2013. 'Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism', *Int J Nanomedicine*, 8: 3255-69.
- Khlebtsov, N., and L. Dykman. 2011. 'Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies', *Chem Soc Rev*, 40: 1647-71.
- Kong, L., M. Tang, T. Zhang, D. Wang, K. Hu, W. Lu, C. Wei, G. Liang, and Y. Pu. 2014. 'Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats', *Int J Mol Sci*, 15: 21253-69.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, and W. Moller. 2006. 'Ultrafine particle-lung interactions: does size matter?', *J Aerosol Med*, 19: 74-83.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, J. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, and G. Oberdorster. 2009. 'Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs', *Inhal Toxicol*, 21 Suppl 1: 55-60.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, S. Takenaka, and W. Moller. 2013. 'Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles', *Acc Chem Res*, 46: 714-22.
- Kreyling, W. G., M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdorster, and A. Ziesenis. 2002. 'Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low', *J Toxicol Environ Health A*, 65: 1513-30.
- Kulkarni, N., N. Pierse, L. Rushton, and J. Grigg. 2006. 'Carbon in airway macrophages and lung function in children', *N Engl J Med*, 355: 21-30.
- Kulvietis, V., V. Zalgevicene, J. Didziapetriene, and R. Rotomskis. 2011. 'Transport of nanoparticles through the placental barrier', *Tohoku J Exp Med*, 225: 225-34.
- Kumar, P., L. Morawska, W. Birmili, P. Paasonen, M. Hu, M. Kulmala, R. M. Harrison, L. Norford, and R. Britter. 2014. 'Ultrafine particles in cities', *Environ Int*, 66: 1-10.

- Kunzmann, A., B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, and B. Fadeel. 2011. 'Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation', *Biochim Biophys Acta*, 1810: 361-73.
- Kwon, J. T., S. K. Hwang, H. Jin, D. S. Kim, A. Minai-Tehrani, H. J. Yoon, M. Choi, T. J. Yoon, D. Y. Han, Y. W. Kang, B. I. Yoon, J. K. Lee, and M. H. Cho. 2008. 'Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice', *J Occup Health*, 50: 1-6.
- Laborda, F., E. Bolea, and J. Jimenez-Lamana. 2014. 'Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis', *Anal Chem*, 86: 2270-8.
- Landsiedel, R., E. Fabian, L. Ma-Hock, B. van Ravenzwaay, W. Wohlleben, K. Wiench, and F. Oesch. 2012. 'Toxico-/biokinetics of nanomaterials', *Arch Toxicol*, 86: 1021-60.
- Le Bihan, O., and L. Malherbe. 2007. "Connaissance de la pollution par les particules submicroniques." In *Métrologie des particules*, 67. INERIS.
- Lee, Y., J. Choi, P. Kim, K. Choi, S. Kim, W. Shon, and K. Park. 2012. 'A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring', *Toxicol Res*, 28: 139-41.
- LeFevre, M. E., F. H. Green, D. D. Joel, and W. Laqueur. 1982. 'Frequency of black pigment in livers and spleens of coal workers: correlation with pulmonary pathology and occupational information', *Hum Pathol*, 13: 1121-6.
- Levy, L., I. S. Chaudhuri, N. Krueger, and R. J. McCunney. 2012. 'Does carbon black disaggregate in lung fluid? A critical assessment', *Chem Res Toxicol*, 25: 2001-6.
- Li, C. H., C. C. Shen, Y. W. Cheng, S. H. Huang, C. C. Wu, C. C. Kao, J. W. Liao, and J. J. Kang. 2012. 'Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice', *Nanotoxicology*, 6: 746-56.
- Li, C., X. Li, A. K. Suzuki, Y. Zhang, Y. Fujitani, K. Nagaoka, G. Watanabe, and K. Taya. 2013. 'Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats', *J Reprod Dev*, 59: 145-50.
- Li, S. D., and L. Huang. 2008. 'Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles', *Mol Pharm*, 5: 496-504.
- Lipka, J., M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W. J. Parak, and W. G. Kreyling. 2010. 'Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection', *Biomaterials*, 31: 6574-81.
- Liu, Y., Y. Gao, L. Zhang, T. Wang, J. Wang, F. Jiao, W. Li, Y. Liu, Y. Li, B. Li, Z. Chai, G. Wu, and C. Chen. 2009. 'Potential health impact on mice after nasal instillation of nano-sized copper particles and their translocation in mice', *J Nanosci Nanotechnol*, 9: 6335-43.
- Liu, Y., Y. C. Tseng, and L. Huang. 2012. 'Biodistribution studies of nanoparticles using fluorescence imaging: a qualitative or quantitative method?', *Pharm Res*, 29: 3273-7.
- Loeschner, K., N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. R. Lam, and E. H. Larsen. 2011. 'Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate', *Part Fibre Toxicol*, 8: 18.
- Lozano, O., J. Laloy, L. Alpan, J. Mejia, S. Rolin, O. Toussaint, J. M. Dogne, S. Lucas, and B. Masereel. 2012. 'Effects of SiC nanoparticles orally administered in a rat model: biodistribution, toxicity and elemental composition changes in feces and organs', *Toxicol Appl Pharmacol*, 264: 232-45.

- Malfatti, M. A., H. A. Palko, E. A. Kuhn, and K. W. Turteltaub. 2012. 'Determining the pharmacokinetics and long-term biodistribution of SiO₂ nanoparticles in vivo using accelerator mass spectrometry', *Nano Lett*, 12: 5532-8.
- Melnik, E. A., Y. P. Buzulukov, V. F. Demin, V. A. Demin, I. V. Gmoshinski, N. V. Tyshko, and V. A. Tutelyan. 2013. 'Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats', *Acta Naturae*, 5: 107-15.
- Menezes, V., A. Malek, and J. A. Keelan. 2011. 'Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure', *Curr Pharm Biotechnol*, 12: 731-42.
- Mercer, R. R., A. F. Hubbs, J. F. Scabilloni, L. Wang, L. A. Battelli, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, and D. W. Porter. 2010. 'Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes', *Part Fibre Toxicol*, 7: 28.
- Mercer, R. R., J. F. Scabilloni, A. F. Hubbs, L. Wang, L. A. Battelli, W. McKinney, V. Castranova, and D. W. Porter. 2013. 'Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure', *Part Fibre Toxicol*, 10: 38.
- Methner, M., L. Hodson, A. Dames, and C. Geraci. 2010. 'Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies', *J Occup Environ Hyg*, 7: 163-76.
- Meunier, P. 1997. 'Protocole pratique de mesurage et d'analyse cardiofréquence-métrique', *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)*, 3: 287-93.
- . 2000. 'Pour une modélisation des profils cardiaques de postes', *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)*, 4: 409-16.
- . 2010. *Cardiofréquence-métrie pratique en milieu de travail* (Edition Docis: Paris).
- Midander, K., K. Elihn, A. Wallen, L. Belova, A. K. Karlsson, and I. O. Wallinder. 2012. 'Characterisation of nano- and micron-sized airborne and collected subway particles, a multi-analytical approach', *Sci Total Environ*, 427-428: 390-400.
- Mills, N. L., N. Amin, S. D. Robinson, A. Anand, J. Davies, D. Patel, J. M. de la Fuente, F. R. Cassee, N. A. Boon, W. Macnee, A. M. Millar, K. Donaldson, and D. E. Newby. 2006. 'Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?', *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 426-31.
- Miserocchi, G., G. Sancini, F. Mantegazza, and G. Chiappino. 2008. 'Translocation pathways for inhaled asbestos fibers', *Environ Health*, 7: 4.
- Misra, S. K., A. Dybowska, D. Berhanu, S. N. Luoma, and E. Valsami-Jones. 2012. 'The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies', *Sci Total Environ*, 438: 225-32.
- Mitchev, K., P. Dumortier, and P. De Vuyst. 2002. 'Black Spots' and hyaline pleural plaques on the parietal pleura of 150 urban necropsy cases', *Am J Surg Pathol*, 26: 1198-206.
- Mohammad, A. K., L. K. Amayreh, J. M. Mazzara, and J. J. Reineke. 2013. 'Rapid lymph accumulation of polystyrene nanoparticles following pulmonary administration', *Pharm Res*, 30: 424-34.
- Mohammadipour, A., A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, M. Hosseini, and A. E. Bideskan. 2014. 'Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring', *Environ Toxicol Pharmacol*, 37: 617-25.
- Mohammed-Brahim, B., and A. Garrigou. 2009. 'Une approche critique du modèle dominant de prévention du risque chimique. L'apport de l'ergotoxicologie', *Activités*, 6: 49-67.

- Moller, P., L. Mikkelsen, L. K. Vesterdal, J. K. Folkmann, L. Forchhammer, M. Roursgaard, P. H. Danielsen, and S. Loft. 2011. 'Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis', *Crit Rev Toxicol*, 41: 339-68.
- Morgan, W. K., R. B. Reger, and D. M. Tucker. 1997. 'Health effects of diesel emissions', *Ann Occup Hyg*, 41: 643-58.
- Muller, K. M., I. Schmitz, and K. Konstantinidis. 2002. 'Black spots of the parietal pleura: morphology and formal pathogenesis', *Respiration*, 69: 261-7.
- Murphy, F. A., C. A. Poland, R. Duffin, K. T. Al-Jamal, H. Ali-Boucetta, A. Nunes, F. Byrne, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Li, S. J. Mather, A. Bianco, M. Prato, W. Macnee, W. A. Wallace, K. Kostarelos, and K. Donaldson. 2011. 'Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura', *Am J Pathol*, 178: 2587-600.
- Myllynen, P. K., M. J. Loughran, C. V. Howard, R. Sormunen, A. A. Walsh, and K. H. Vahakangas. 2008. 'Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta', *Reprod Toxicol*, 26: 130-7.
- Nakane, H. 2012. 'Translocation of particles deposited in the respiratory system: a systematic review and statistical analysis', *Environ Health Prev Med*, 17: 263-74.
- Naota, M., A. Shimada, T. Morita, K. Inoue, and H. Takano. 2009. 'Translocation pathway of the intratracheally instilled C60 fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis', *Toxicol Pathol*, 37: 456-62.
- Nemmar, A., P. H. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M. F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, and B. Nemery. 2002. 'Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans', *Circulation*, 105: 411-4.
- Nikula, K. J., K. J. Avila, W. C. Griffith, and J. L. Mauderly. 1997. 'Sites of particle retention and lung tissue responses to chronically inhaled diesel exhaust and coal dust in rats and cynomolgus monkeys', *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 5: 1231-4.
- NIOSH. 2003. "Monitoring of Diesel Particulate Exhaust in the Workplace." In *Manual of Analytical Methods (NMAM)*, edited by PF O'Connor and PC Schlecht. Cincinnati: NIOSH.
- O'Hagan, D. T. 1996. 'The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery', *J Anat*, 189 (Pt 3): 477-82.
- Oberdorster, G., A. Elder, and A. Rinderknecht. 2009. 'Nanoparticles and the brain: cause for concern?', *J Nanosci Nanotechnol*, 9: 4996-5007.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, and C. Cox. 2004. 'Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain', *Inhal Toxicol*, 16: 437-45.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, A. Lunts, W. Kreyling, and C. Cox. 2002. 'Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats', *J Toxicol Environ Health A*, 65: 1531-43.
- Ostiguy, Claude, Gilles Lapointe, Luc Ménard, Yves Cloutier, Mylène Trottier, Michel Boutin, Monty Antoun, and Christian Normand. 2006. "Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures." In *Studies and Research Projects*, 100. Montreal: IRSST.
- Paasonen, P, A Visshedjik, K Kupiainen, Z Klimont, H Denier van der Gon, and M Kulmala. 2013. "Aerosol particle number emissions and size distributions: Implementation in

- the GAINS model and initial results." In, 28. Laxenburg, Austria: IIASA International Institute for Applied Systems Analysis.
- Pairon, J. C., L. Martinon, and P. Brochard. 1998. '[Mineral analysis and study of asbestos pathology]', *Rev Mal Respir*, 15: 141-9.
- Pappas, R. S., N. Gray, N. Gonzalez-Jimenez, M. Fresquez, and C. H. Watson. 2015. 'Triple Quad-ICP-MS Measurement of Toxic Metals in Mainstream Cigarette Smoke from Spectrum Research Cigarettes', *J Anal Toxicol*.
- Park, C. W., Y. S. Rhee, F. G. Vogt, D. Hayes, Jr., J. B. Zwischenberger, P. P. DeLuca, and H. M. Mansour. 2012. 'Advances in microscopy and complementary imaging techniques to assess the fate of drugs ex vivo in respiratory drug delivery: an invited paper', *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 344-56.
- Park, E. J., E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon, B. C. Lee, and K. Park. 2010. 'Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles', *Environ Toxicol Pharmacol*, 30: 162-8.
- Penconek, A., P. Drazzyk, and A. Moskal. 2013. 'Penetration of diesel exhaust particles through commercially available dust half masks', *Ann Occup Hyg*, 57: 360-73.
- Pereira Ade, S., N. R. Grande, E. Carvalho, and A. Ribeiro. 1992. 'Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma', *Acta Anat (Basel)*, 145: 416-9.
- Petitot, F., P. Lestaevel, E. Turlonias, C. Mazzucco, S. Jacquinet, B. Dhieux, O. Delissen, B. B. Tournier, F. Gensdarmes, P. Beaunier, and I. Dublineau. 2013. 'Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats', *Toxicol Lett*, 217: 217-25.
- Phillips, J. I., F. Y. Green, J. C. Davies, and J. Murray. 2010. 'Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles', *Am J Ind Med*, 53: 763-7.
- Pietrojusti, A., L. Campagnolo, and B. Fadeel. 2013. 'Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers', *Small*, 9: 1557-72.
- Powell, J. J., N. Faria, E. Thomas-McKay, and L. C. Pele. 2010. 'Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract', *J Autoimmun*, 34: J226-33.
- Pradeau, C., V. Rondeau, E. Leveque, P. Y. Guernion, E. Tentillier, M. Thicoipe, and P. Brochard. 2015. 'Air pollution and activation of mobile medical team for out-of-hospital cardiac arrest', *Am J Emerg Med*, 33: 367-72.
- Qi, W., J. Bi, X. Zhang, J. Wang, J. Wang, P. Liu, Z. Li, and W. Wu. 2014. 'Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times', *Sci Rep*, 4: 4352.
- Rattanapinyopituk, K., A. Shimada, T. Morita, M. Sakurai, A. Asano, T. Hasegawa, K. Inoue, and H. Takano. 2014. 'Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles', *J Vet Med Sci*, 76: 377-87.
- Refuerzo, J. S., B. Godin, K. Bishop, S. Srinivasan, S. K. Shah, S. Amra, S. M. Ramin, and M. Ferrari. 2011. 'Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats', *Am J Obstet Gynecol*, 204: 546.e5-9.
- Rendall, R. E., J. I. Phillips, and K. A. Renton. 1994. 'Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process', *Ann Occup Hyg*, 38: 921-30.

- Rinaldo, M., P. Andujar, A. Lacourt, L. Martinon, M. Canal Raffin, P. Dumortier, J. C. Pairon, and P. Brochard. 2015. 'Perspectives in Biological Monitoring of Inhaled Nanosized Particles', *Ann Occup Hyg*.
- Ristovski, Z. D., B. Miljevic, N. C. Surawski, L. Morawska, K. M. Fong, F. Goh, and I. A. Yang. 2012. 'Respiratory health effects of diesel particulate matter', *Respirology*, 17: 201-12.
- Riviere, J. E. 2009. 'Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots', *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 26-34.
- Roggli, V. L., C. A. Piantadosi, and D. Y. Bell. 1986. 'Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid. A study of 20 asbestos-exposed individuals and comparison to patients with other chronic interstitial lung diseases', *Acta Cytol*, 30: 470-6.
- Roller, J., M. W. Laschke, T. Tschernig, R. Schramm, N. T. Veith, H. Thorlacius, and M. D. Menger. 2011. 'How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung', *Nanomedicine (Lond)*, 7: 753-62.
- Rudell, B., M. C. Ledin, U. Hammarstrom, N. Stjernberg, B. Lundback, and T. Sandstrom. 1996. 'Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust', *Occup Environ Med*, 53: 658-62.
- Ryman-Rasmussen, J. P., M. F. Cesta, A. R. Brody, J. K. Shipley-Phillips, J. I. Everitt, E. W. Tewksbury, O. R. Moss, B. A. Wong, D. E. Dodd, M. E. Andersen, and J. C. Bonner. 2009. 'Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice', *Nat Nanotechnol*, 4: 747-51.
- Sa, L. T., S. Albernaz Mde, B. F. Patricio, M. V. Falcao, Jr., B. F. Coelho, A. Bordim, J. C. Almeida, and R. Santos-Oliveira. 2012. 'Biodistribution of nanoparticles: initial considerations', *J Pharm Biomed Anal*, 70: 602-4.
- Sadauskas, E., N. R. Jacobsen, G. Danscher, M. Stoltenberg, U. Vogel, A. Larsen, W. Kreyling, and H. Wallin. 2009. 'Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation', *Chem Cent J*, 3: 16.
- Sarlo, K., K. L. Blackburn, E. D. Clark, J. Grothaus, J. Chaney, S. Neu, J. Flood, D. Abbott, C. Bohne, K. Casey, C. Fryer, and M. Kuhn. 2009. 'Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat', *Toxicology*, 263: 117-26.
- Saunders, M. 2009. 'Transplacental transport of nanomaterials', *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 671-84.
- Sauvain, J. J., M. S. Hohl, P. Wild, J. A. Pralong, and M. Riediker. 2014. 'Exhaled breath condensate as a matrix for combustion-based nanoparticle exposure and health effect evaluation', *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 27: 449-58.
- Schenker, M. B., K. E. Pinkerton, D. Mitchell, V. Vallyathan, B. Elvine-Kreis, and F. H. Green. 2009. 'Pneumoconiosis from agricultural dust exposure among young California farmworkers', *Environ Health Perspect*, 117: 988-94.
- Schleh, C., U. Holzwarth, S. Hirn, A. Wenk, F. Simonelli, M. Schaffler, W. Moller, N. Gibson, and W. G. Kreyling. 2013. 'Biodistribution of inhaled gold nanoparticles in mice and the influence of surfactant protein D', *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 26: 24-30.

- Schmid, O., W. Moller, M. Semmler-Behnke, G. A. Ferron, E. Karg, J. Lipka, H. Schulz, W. G. Kreyling, and T. Stoeger. 2009. 'Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles', *Biomarkers*, 14 Suppl 1: 67-73.
- Schneider, F., T. A. Sporn, and V. L. Roggli. 2010. 'Asbestos fiber content of lungs with diffuse interstitial fibrosis: An analytical scanning electron microscopic analysis of 249 cases', *Arch Pathol Lab Med*, 134: 457-61.
- Searl, A., and R. T. Cullen. 1997. 'An enzymatic tissue digestion method for fibre biopersistence studies', *Ann Occup Hyg*, 41: 721-7.
- Seaton, A., J. Cherrie, M. Dennekamp, K. Donaldson, J. F. Hurley, and C. L. Tran. 2005. 'The London Underground: dust and hazards to health', *Occup Environ Med*, 62: 355-62.
- Sebastien, P., X. Janson, A. Gaudichet, A. Hirsch, and J. Bignon. 1980. 'Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura', *IARC Sci Publ*: 237-46.
- Semmler-Behnke, M., W. G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid, and W. Brandau. 2008. 'Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats', *Small*, 4: 2108-11.
- Semmler-Behnke, M., J. Lipka, A. Wenk, S. Hirn, M. Schaffler, F. Tian, G. Schmid, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2014. 'Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat', *Part Fibre Toxicol*, 11: 33.
- Semmler, M., J. Seitz, F. Erbe, P. Mayer, J. Heyder, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2004. 'Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs', *Inhal Toxicol*, 16: 453-9.
- Shepard, M. N., and S. Brenner. 2014. 'An occupational exposure assessment for engineered nanoparticles used in semiconductor fabrication', *Ann Occup Hyg*, 58: 251-65.
- Shi, H., R. Magaye, V. Castranova, and J. Zhao. 2013. 'Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data', *Part Fibre Toxicol*, 10: 15.
- Shimada, A., N. Kawamura, M. Okajima, T. Kaewamatawong, H. Inoue, and T. Morita. 2006. 'Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse', *Toxicol Pathol*, 34: 949-57.
- Shinohara, N., T. Nakazato, M. Tamura, S. Endoh, H. Fukui, Y. Morimoto, T. Myojo, M. Shimada, K. Yamamoto, H. Tao, Y. Yoshida, and J. Nakanishi. 2010. 'Clearance kinetics of fullerene C(6)(0) nanoparticles from rat lungs after intratracheal C(6)(0) instillation and inhalation C(6)(0) exposure', *Toxicol Sci*, 118: 564-73.
- Singh, R., D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco, and K. Kostarelos. 2006. 'Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 3357-62.
- Song, Y., X. Li, and X. Du. 2009. 'Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma', *Eur Respir J*, 34: 559-67.
- Song, Y., X. Li, L. Wang, Y. Rojanasakul, V. Castranova, H. Li, and J. Ma. 2011. 'Nanomaterials in humans: identification, characteristics, and potential damage', *Toxicol Pathol*, 39: 841-9.
- Sonnegaard Poulsen, M., T. Mose, L. Leth Maroun, L. Mathiesen, L. Ehlert Knudsen, and E. Rytting. 2013. 'Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta', *Nanotoxicology*.

- Stark, W. J. 2011. 'Nanoparticles in biological systems', *Angew Chem Int Ed Engl*, 50: 1242-58.
- Stettler, L. E., D. D. Sharpnack, and E. F. Krieg. 2008. 'Chronic inhalation of short asbestos: lung fiber burdens and histopathology for monkeys maintained for 11.5 years after exposure', *Inhal Toxicol*, 20: 63-73.
- Stieb, D. M., L. Chen, M. Eshoul, and S. Judek. 2012. 'Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis', *Environ Res*, 117: 100-11.
- Sung, J. H., J. H. Ji, J. D. Park, M. Y. Song, K. S. Song, H. R. Ryu, J. U. Yoon, K. S. Jeon, J. Jeong, B. S. Han, Y. H. Chung, H. K. Chang, J. H. Lee, D. W. Kim, B. J. Kelman, and I. J. Yu. 2011. 'Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles', *Part Fibre Toxicol*, 8: 16.
- Sydbom, A., A. Blomberg, S. Parnia, N. Stenfors, T. Sandstrom, and S. E. Dahlen. 2001. 'Health effects of diesel exhaust emissions', *Eur Respir J*, 17: 733-46.
- Takahashi, Y., K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio, and K. Takeda. 2010. 'Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice', *J Toxicol Sci*, 35: 749-56.
- Takeda, Ken, Ken-ichiro Suzuki, Aki Ishihara, Miyoko Kubo-Irie, Rie Fujimoto, Masako Tabata, Shigeru Oshio, Yoshimasa Nihei, Tomomi Ihara, and Masao Sugamata. 2009. 'Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems', *J. Health Sci*, 55: 95-102.
- Takenaka, S., E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, W. Moller, M. Behnke-Semmler, L. Jennen, A. Walch, B. Michalke, P. Schramel, J. Heyder, and H. Schulz. 2006. 'Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung', *Inhal Toxicol*, 18: 733-40.
- Takenaka, S., E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, H. Schulz, A. Ziesenis, P. Schramel, and J. Heyder. 2004. 'Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung', *Inhal Toxicol*, 16 Suppl 1: 83-92.
- Takenaka, S., E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel, and J. Heyder. 2001. 'Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats', *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 4: 547-51.
- Tassinari, R., F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi, and F. Maranghi. 2014. 'Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen', *Nanotoxicology*, 8: 654-62.
- Theegarten, D., S. Boukercha, S. Philippou, and O. Anhehn. 2010. 'Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report', *Diagn Pathol*, 5: 77.
- Tian, X., M. Zhu, L. Du, J. Wang, Z. Fan, J. Liu, Y. Zhao, and G. Nie. 2013. 'Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy', *Small*, 9: 2432-9.
- Tiede, K., A. B. Boxall, S. P. Tear, J. Lewis, H. David, and M. Hasselov. 2008. 'Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment', *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 25: 795-821.
- Tsutsumi, Y., and Y. Yoshioka. 2011. 'Quantifying the biodistribution of nanoparticles', *Nat Nanotechnol*, 6: 755.

- Tsyganova, N. A., R. M. Khairullin, G. S. Terentyuk, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, S. N. Erykov, and N. G. Khlebtsov. 2014. 'Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier', *Bull Exp Biol Med*, 157: 383-5.
- Umezawa, M., H. Tainaka, N. Kawashima, M. Shimizu, and K. Takeda. 2012. 'Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information', *J Toxicol Sci*, 37: 1247-52.
- van der Zande, M., R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. Peters, P. C. Hollman, P. J. Hendriksen, H. J. Marvin, A. A. Peijnenburg, and H. Bouwmeester. 2012. 'Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure', *ACS Nano*, 6: 7427-42.
- van Ravenzwaay, B., R. Landsiedel, E. Fabian, S. Burkhardt, V. Strauss, and L. Ma-Hock. 2009. 'Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz', *Toxicol Lett*, 186: 152-9.
- Wallenborn, J. G., J. K. McGee, M. C. Schladweiler, A. D. Ledbetter, and U. P. Kodavanti. 2007. 'Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats', *Toxicol Sci*, 98: 231-9.
- Wang, B., W. Y. Feng, T. C. Wang, G. Jia, M. Wang, J. W. Shi, F. Zhang, Y. L. Zhao, and Z. F. Chai. 2006. 'Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice', *Toxicol Lett*, 161: 115-23.
- Wang, H., S. T. Yang, A. Cao, and Y. Liu. 2013. 'Quantification of carbon nanomaterials in vivo', *Acc Chem Res*, 46: 750-60.
- Wang, J., C. Chen, Y. Liu, F. Jiao, W. Li, F. Lao, Y. Li, B. Li, C. Ge, G. Zhou, Y. Gao, Y. Zhao, and Z. Chai. 2008. 'Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO(2) nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases', *Toxicol Lett*, 183: 72-80.
- Wang, J., Y. Chen, B. Chen, J. Ding, G. Xia, C. Gao, J. Cheng, N. Jin, Y. Zhou, X. Li, M. Tang, and X. M. Wang. 2010. 'Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles in mice', *Int J Nanomedicine*, 5: 861-6.
- Wang, J., Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, and C. Chen. 2008. 'Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO(2) nanoparticles', *Toxicology*, 254: 82-90.
- Wang, T., H. Hsieh, Y. Hsieh, C. Chiang, Y. Sun, and C. Wang. 2012. 'The in vivo biodistribution and fate of CdSe quantum dots in the murine model: a laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study', *Anal Bioanal Chem*, 404: 3025-36.
- WHO. 2013. "Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project." In, 122. Copenhagen, Denmark: World Health Organization.
- Wichmann, H. E. 2007. 'Diesel exhaust particles', *Inhal Toxicol*, 19 Suppl 1: 241-4.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, and U. von Mandach. 2010. 'Barrier capacity of human placenta for nanosized materials', *Environ Health Perspect*, 118: 432-6.
- Wiebert, P., A. Sanchez-Crespo, J. Seitz, R. Falk, K. Philipson, W. G. Kreyling, W. Moller, K. Sommerer, S. Larsson, and M. Svartengren. 2006. 'Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs', *Eur Respir J*, 28: 286-90.

- Wu, J., C. Yu, Y. Tan, Z. Hou, M. Li, F. Shao, and X. Lu. 2015. 'Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats', *Environ Res*, 138c: 67-73.
- Wu, M., R. E. Gordon, R. Herbert, M. Padilla, J. Moline, D. Mendelson, V. Litle, W. D. Travis, and J. Gil. 2010. 'Case report: Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nanotubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples', *Environ Health Perspect*, 118: 499-504.
- Xu, J., M. Futakuchi, H. Shimizu, D. B. Alexander, K. Yanagihara, K. Fukamachi, M. Suzui, J. Kanno, A. Hirose, A. Ogata, Y. Sakamoto, D. Nakae, T. Omori, and H. Tsuda. 2012. 'Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats', *Cancer Sci*, 103: 2045-50.
- Xu, Y., L. Barregard, J. Nielsen, A. Gudmundsson, A. Wierzbicka, A. Axmon, B. A. Jonsson, M. Karedal, and M. Albin. 2013. 'Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study', *Part Fibre Toxicol*, 10: 60.
- Yamashita, K., Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T. Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, and Y. Tsutsumi. 2011. 'Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice', *Nat Nanotechnol*, 6: 321-8.
- Yang, H., C. Sun, Z. Fan, X. Tian, L. Yan, L. Du, Y. Liu, C. Chen, X. J. Liang, G. J. Anderson, J. A. Keelan, Y. Zhao, and G. Nie. 2012. 'Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy', *Sci Rep*, 2: 847.
- Yang, W., J. I. Peters, and R. O. Williams, 3rd. 2008. 'Inhaled nanoparticles--a current review', *Int J Pharm*, 356: 239-47.
- Yoshida, S., K. Hiyoshi, S. Oshio, H. Takano, K. Takeda, and T. Ichinose. 2010. 'Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring', *Fertil Steril*, 93: 1695-9.
- Yu, T., D. Hubbard, A. Ray, and H. Ghandehari. 2012. 'In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics', *J Control Release*, 163: 46-54.
- Zhang, X., J. Yin, C. Kang, J. Li, Y. Zhu, W. Li, Q. Huang, and Z. Zhu. 2010. 'Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation', *Toxicol Lett*, 198: 237-43.
- Zhu, M. T., W. Y. Feng, Y. Wang, B. Wang, M. Wang, H. Ouyang, Y. L. Zhao, and Z. F. Chai. 2009. 'Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment', *Toxicol Sci*, 107: 342-51.
- Zimmer, A. T., and A. D. Maynard. 2002. 'Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates', *Ann Occup Hyg*, 46: 663-72.
- Zocchi, L. 2002. 'Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover', *Eur Respir J*, 20: 1545-58.

Annexes

1. Annexe 1 : Mode opératoire LEPI

MODE OPERATOIRE : IDENTIFICATION ET COMPTAGE DES PARTICULES DANS LE PARENCHYME PULMONAIRE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Page 1/4

OBJET : Identification et comptage des particules dans le parenchyme pulmonaire en microscopie électronique

METHODE : Microscopie Electronique à Transmission Analytique

LISTE DE MATERIEL UTILISE

- Bêchers
- Agitateur
- Pompe de filtration
- Unités de filtration
- Membranes en polycarbonate Nucléopore – 0,4 micron de porosité –25 mm ou 47 mm de diamètre
- Membranes en ester de cellulose Millipore – 0,45 micron de porosité –25 ou 47 mm de diamètre
- Alcool isopropylique
- Hypochlorite de Sodium
- Pince Millipore
- Epprouvettes
- Lames
- Parafilm
- Balance
- Etuve
- Hotte à flux laminaire
- Microscope Electronique à Transmission (META)
- Four à plasma
- Evaporateur sous vide
- Grilles de cuivre de 200 mesh
- Scalpel/lames
- Pétrislid
- Chloroforme
- Boite de grilles
- Filtres MILLEX 25 mm de diamètre, 0,22 μ de porosité

PREPARATION DES ECHANTILLONS :

- Travailler sous hotte à flux laminaire en position travail
- Déposer le prélèvement sur une grande lame
- Couper 2 morceaux de parenchyme 1 et 2
- Les égoutter à l'aide de papier absorbant
- Les peser sur la balance pour obtenir PH1 et PH2 (PH= Poids Humide)
- Noter les poids sur le registre noir Biologie-MET
- Filtrer l'hypochlorite de sodium nécessaire à la digestion avec une seringue + MILLEX
- Mettre le morceau n°1 dans un bécher avec un barreau aimanté, y verser de l'hypochlorite de Sodium
- Mettre sous agitation magnétique
- Laisser digérer environ 1 h
- Mettre à sécher le morceau n° 2 à l'étuve à environ 60° pendant au moins 24 h
- Le peser pour obtenir le PS2 (PS = Poids Sec)
- Noter le poids sur le registre noir Biologie-MET
- Un témoin analyse est préparé simultanément

Filtration :

- Mesurer le volume du digestat à l'éprouvette au cas où la totalité ne pourrait pas être filtrée
- Selon l'aspect trouble ou opaque du digestat, utiliser un système de filtration de 25 mm ou de 47 mm de diamètre
- Mettre quelques ml d'alcool isopropylique sur la base de filtration, déposer à l'aide d'une pince Millipore le filtre Nucléopore prémétallisé au carbone (face brillante carbonée sur le dessus).
- Adapter l'entonnoir de filtration au dessus et serrer l'ensemble avec la pince adaptée
- Vérifier l'étanchéité du système en versant dans l'entonnoir quelques ml d'eau déminéralisée puis allumer la pompe pour faire passer l'eau.
- Filtrer le digestat dans l'entonnoir * et le rincer avec de l'eau déminéralisée
- Rincer le bécher, l'éprouvette avec de l'eau déminéralisée
- Verser cette eau de rinçage dans l'entonnoir et y rajouter de l'eau déminéralisée si nécessaire
- Prélever le filtre avec une pince Millipore, le déposer dans un pétrislide, préalablement étiqueté et faire sécher le filtre environ 5 minutes à l'étuve couvercle entrouvert.
- Remettre la hotte à flux laminaire en position attente

METALLISATION :

- Une fois sec, le filtre est métallisé dans l'évaporateur

TRANSFERT :

- Faire le transfert, sous la hotte, sur des grilles de cuivre de 200 mesh provenant d'un lot dont la surface moyenne d'ouverture de grille a été mesurée (coefficient de variation < 5 %) selon la norme NF X 43-050
- Transférer au moins 2 grilles et les ranger dans la boîte de grilles en cours.
- Ranger le pétrislide (stockage)

***a) Si mauvaise filtration du digestat (temps trop long) :**

- Rincer à l'eau déminéralisée.
- Brûler le Nucléopore dans le four à plasma
- Refiltrer les cendres sur un Nucléopore comme précédemment (1).

***b) Si arrêt total de la filtration sur le Nucléopore :**

- Arrêter la filtration.
- Mesurer le volume du digestat restant dans l'éprouvette.
- Le filtrer sur une membrane Millipore comme précédemment (1).
- Brûler dans un bécher dans le four à plasma.
- Reprendre les cendres dans de l'eau déminéralisée et refiltrer sur une membrane Nucléopore de 25 mm de diamètre.

***c) Si l'aspect du digestat est trouble ou opaque :**

- Filtrer directement sur Millipore.
- Brûler dans un bécher dans le four à plasma ;
- Reprendre les cendres dans de l'eau déminéralisée et refiltrer sur une membrane Nucléopore de 25 mm de diamètre ;

OBSERVATION :

Au microscope électronique à transmission analytique équipé d'un analyseur en dispersion d'énergie des rayons X

- Réglage du META selon la notice N4T3

- Observation à faible grossissement :

- . Elimination de la grille si : - dissolution incomplète
 - plus du quart des ouvertures déchirées

- . Si les grilles sont illisibles (trop chargées en particules ou agglomérats) :

S'il reste du parenchyme pulmonaire on reprepare une quantité moindre sur une membrane Millipore qui sera brûlée puis refiltrée sur Nucléopore

COMPTAGE :

- Remplir la fiche d'analyse E129S1PB
 - **Calculer le nombre d'ouvertures de grilles (nc) à examiner en fonction de la sensibilité d'analyse souhaitée (Sa : $1,5 \times 10^5$ particules/g), lire au minimum 4 carreaux.**
 - Compter le nombre de particules sur le nombre d'ouverture calculé. Si le résultat final est $< 10^8$ particules/g on ne fait pas l'identification.
 - Si le résultat final est $\geq 10^8$ particules/g, on fait l'identification de 50 particules : observer au moins 2 grilles à un grossissement de 25 000. Chaque particule observée sur des champs au hasard est analysée et mesurée et son spectre est enregistré, le formulaire E129S1PB est rempli et le pourcentage des particules est calculé.
 - En cas de nombreuses particules (en moyenne plus de 25 particules par carreaux), compter 200 particules sur au minimum 4 ouvertures de grille.
 - Si les particules sont très nombreuses, faire un comptage par champs au hasard sur 30 champs à un grossissement approprié (15 000 à 25 000).
- **Le témoin** analyse n'est lu (compter les particules sur 10 carreaux) que si la charge particulaire est $\geq 10^8$ particules/g. Le témoin analyse ne doit pas avoir plus de 10 particules par carreau, dans ce cas, rechercher la cause de la présence des particules.

- Calculer la concentration numérique $C = N \times Sa$

C = concentration en nombre de particules par g arrondi à 2 chiffres après la virgule en 10^7

N = nombre total de particules comptées

Sa = sensibilité d'analyse calculée = $1 \times S/s \times PS1 \times nc$

(PS1 : Poids sec - S : surface de filtration** - s : surface moyenne d'une ouverture de grille)

La référence utilisée provient de la série de sujets témoins non exposée professionnellement dont la concentration est : $9 \pm 8 \times 10^7$ p/g de tissu sec [1×10^7 p/g – 17×10^7 p/g]

BLANCS :

Une membrane de chaque boîte de 100 est préparée et lue. Les résultats sont notés sur les formulaires E62G2 pour les membranes en ester de cellulose et le formulaire E61G2 pour les membranes en polycarbonate.

Un témoin eau déminéralisée est préparé chaque mois en filtrant 100 ml d'eau sur un filtre Nucléopore. Lire 10 carreaux au META et enregistrer les résultats sur le formulaire E88G2.

STOCKAGE :

S'il reste du parenchyme pulmonaire, rajouter du formol dépoussiéré dans le flacon et stocker l'échantillon restant pendant un minimum de 5 ans.

**Surface de filtration : Mesurer la surface de filtration tous les ans

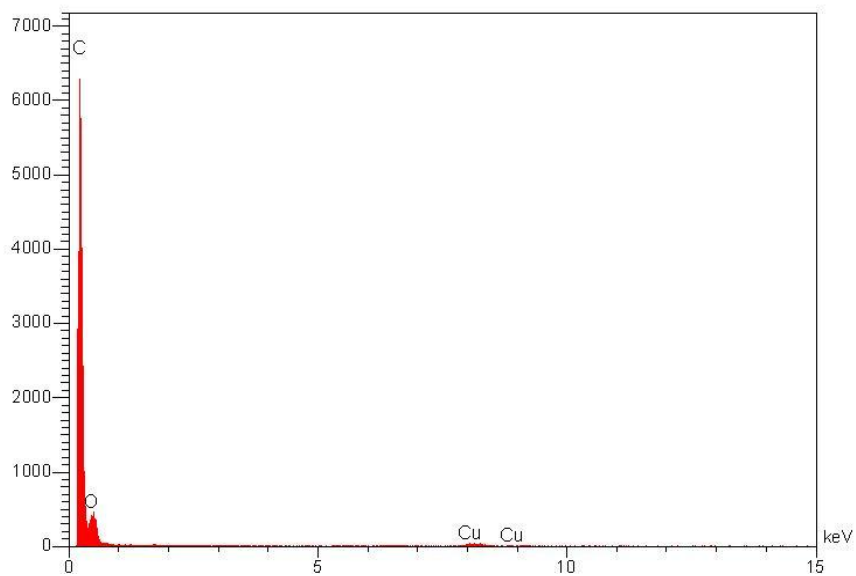
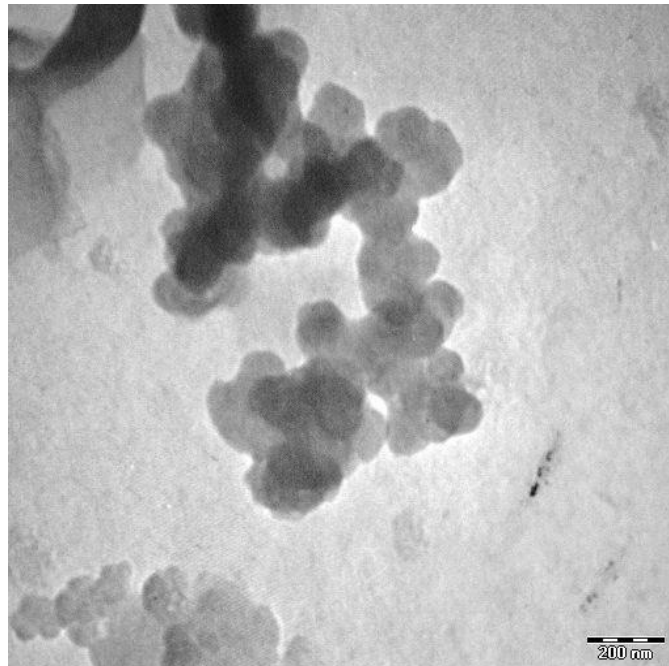
Préparer une suspension d'alcool isopropylique et de poudre de carbone

Mesurer le diamètre de filtration avec le pied à coulisse I102

Calculer le diamètre moyen, l'écart type et la surface de filtration

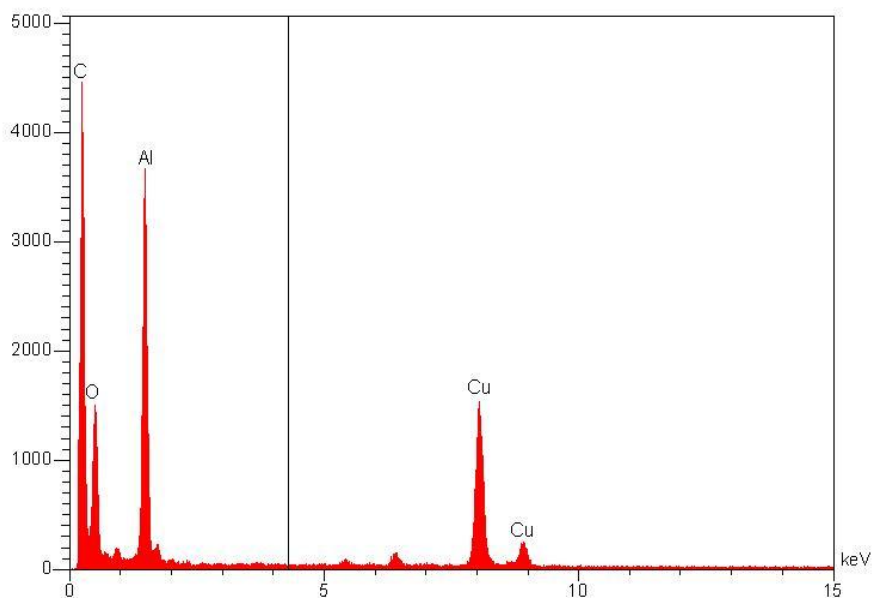
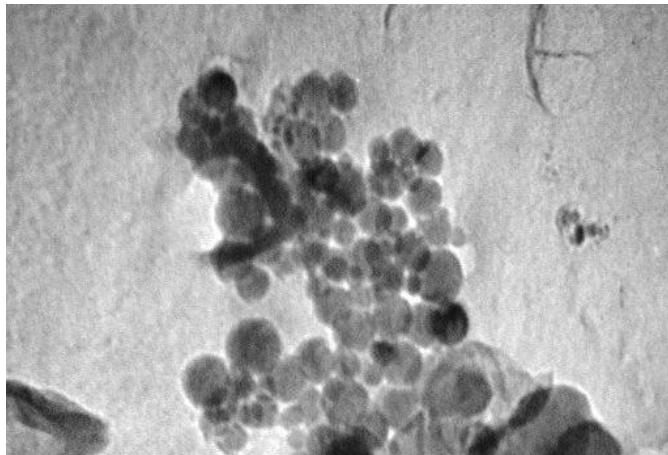
Compléter le formulaire E80S1PP

2. Annexe 2 : Extrait du portfolio Nanotrans



Agrégat de Carbone

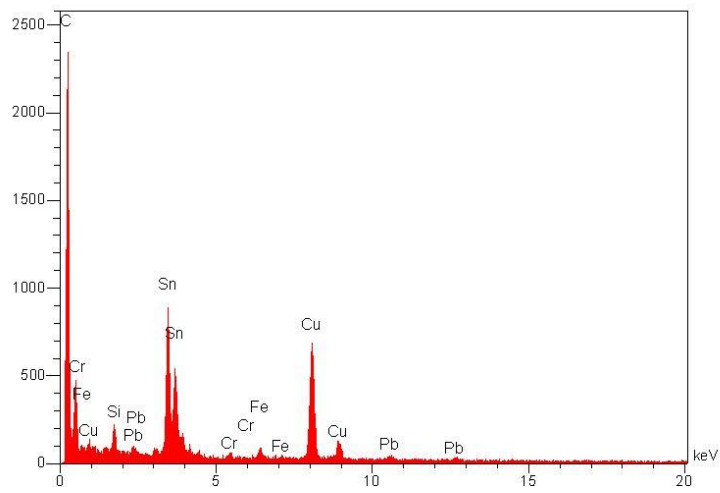
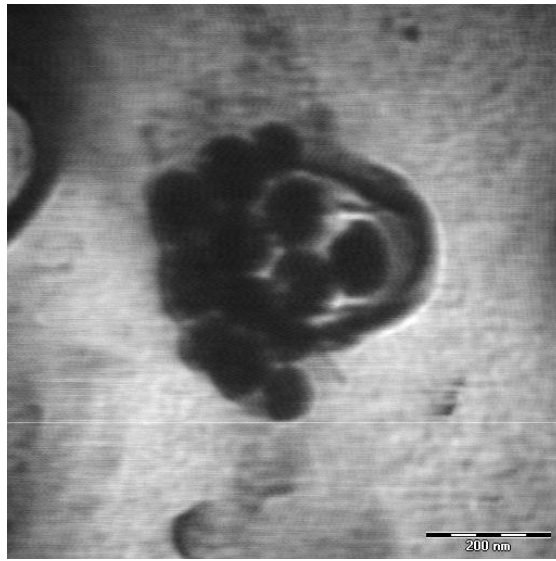
- Dossier : 11.03.25
- Echantillon : soudeur 36464



Agrégat NP Aluminium

- Dossier :11.03.25
- Echantillon : 39792

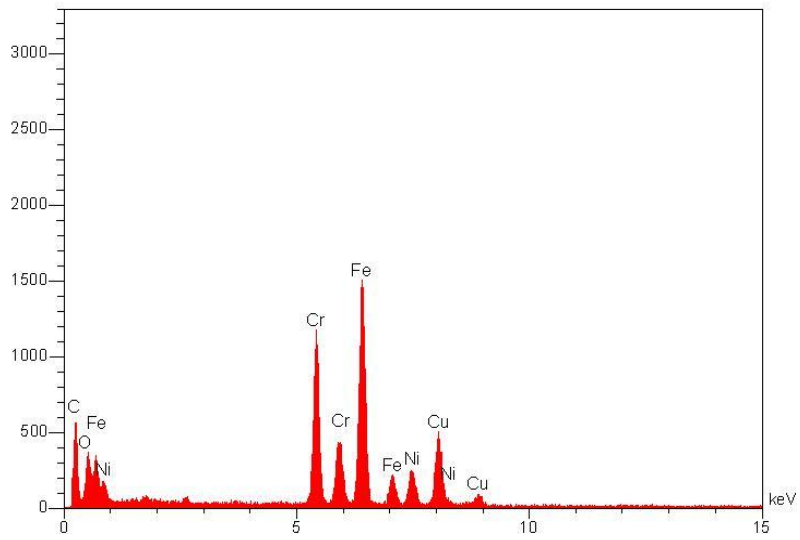
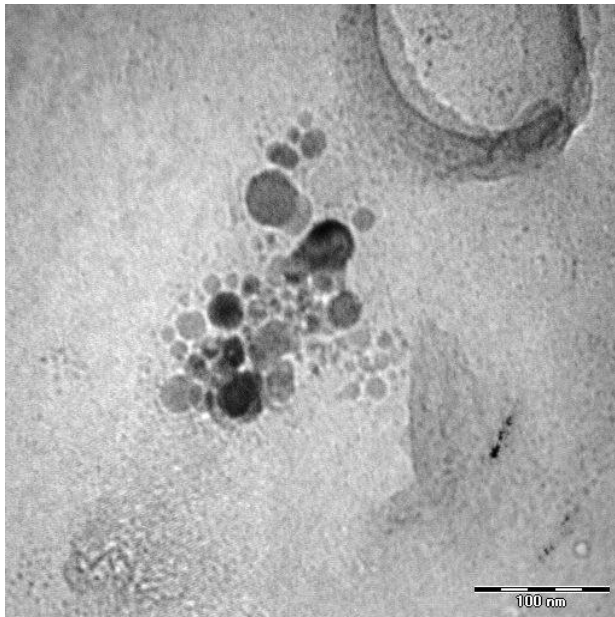
12



Agrégat de NP d'étain

- Dossier : 11.03.14
- Echantillon : soudeur 33878

19



Agrégat de NP Fe Cr Ni

- Dossier :11.03.25
- Echantillon : 39792

24

4. Annexe 4 : Liste des communications et publications associées à la thèse

Publications acceptées

Rinaldo M, Pascal Andujar P, Lacourt A, Martinon L, Canal Raffin M, Janson X, Dumortier P, Pairon JC, Brochard P Perspectives in biological monitoring of inhaled nanosized particles. *Ann. Occup. Hyg.*, 2015, 1–12

Publications soumises

Rinaldo M, Lacourt A, Saura R, André G, Andujar P, Audignon S, Carles D, Dallay D, Guernion PY, Horovitz J, Janson X, Pelluard F, Sellier E, Martinon L, Brochard P Nanosized particles in fetal lung tissues. *Environmental Research* soumise en Septembre 2015

Rinaldo M, Lacourt A, , Andujar P, Martinon L, Janson X, Pairon JC, Canal Raffin M, Sellier E, Dumortier P, Brochard P. Retention of inhaled fine and ultrafine particles to by the pleura and accumulation in black spots. *Respiration* soumise en Aout 2015

Publications en préparation

Rinaldo M, Bonga Bouna K, Bouvier B, Canal-Raffin M, Jouannique V, Lacourt A, Lecoin L, Mohammed-Brahim B, Pasquereau P, Sellier S, Brochard P Alain Garrigou A. Characterization of occupational exposure to particles and chemicals emitted during rail grinding maintenance in the Paris metro: a multidisciplinary approach. Soumis à *Ann. Occup. Hyg* en Novembre 2015.

Communications orales

Rinaldo M, Brochard P. Biométrie des particules ultrafines : application dans le cadre de deux études. Rencontre scientifiques ANSES. Paris Octobre 2015.

Rinaldo M, Andujar P, Lacourt A, Martinon L, Canal Raffin M, Dumortier P, Pairon JC, Brochard P. Surveillance biologique des nanoparticules inhalees. 26ème journées Franco Suisse de médecine du travail, Strasbourg 11 et 12 juin 2015.

Rinaldo M. FOETOPUF : étude de la rétention de pulmonaire foetale en particules fines et ultrafine. 31ème congrès de santé au travail de Toulouse Juin 2010

Communications affichées

Ultrafine particles in human pleura. Rinaldo M, Lacourt A, Andujar P, Martinon M, Janson X, Pairon JC, Canal raffin M, Sellier E, Dumortier P, Brochard P. 19th ETH Conference on Combustion Generated Nanoparticles Zurich Suisse 28 Juin-1er Juillet 2015.

Translocation des particules ultrafines dans la plèvre. Rinaldo M, Lacourt A, Andujar P, Martinon M, Janson X, Pairon JC, Canal raffin M, Sellier E, Dumortier P, Brochard P. 26ème journées Franco Suisses de médecine du travail. Strasbourg 11 et 12 juin 2015

Nanoparticles characterization in human lung tissue and biological fluids by transmission electron microscopy : assessment of the possible bias during sample preparation M Rinaldo,

A Lacourt, X Janson, L Martinon, JC Pairon, P Brochard. Congrès Inhaled Particle Nottingham Septembre 2013

NANOTRANS Study Evaluation of the human tissue distribution of fine and ultrafine particles M Rinaldo, MA Billon-Galland, P Dumortier, S Gromb, J-C Pairon, E Sellier, A Vital, P Brochard. Colloque INRS Nano 2011 5-7 Avril 2011

Etude NANOTRANS : Etude de la distribution tissulaire des particules fines et ultrafines chez l'homme. M Rinaldo, MA Billon-Galland, P Dumortier, S Gromb, J-C Pairon, E Sellier, A Vital, P Brochard. Journée des risques émergents. AFSSET Paris 11 Mai 2010

Autres travaux scientifiques

Etude ergotoxicologique des situations à risque liées aux opérations de meulage des rails (dites « SPENO ») dans les tunnels du métro parisien. Sous la direction d'Alain Garrigou et de Brahim Mohammed-Brahim. Rapport final (rédaction de la partie 3 : Interprétation de la caractérisation de l'émission des particules ultrafines lors d'un chantier de maintenance SPENO)

5. Annexe 5 : Publications associées à la thèse

INTRODUCTION

Nano-objects are defined by the International Organization for Standardization as material with one, two, or three external dimensions in the size range 1–100 nm. This definition includes nanofibers (nano-objects with two similar external dimensions in the nanoscale) and nanoparticles (NP; nano-objects with all three external dimensions in the nanoscale; ISO, 2011). However, toxicological and biokinetic properties specific to nanomaterials can be found for particles above 100 nm (Kendall *et al.*, 2012) and probably up to 500 nm (Oberdörster *et al.*, 2009). NP can be intentionally manufactured or unintentionally produced [such as combustion-derived ultrafine particles, that differ from the former by their polydispersed diameter and complex chemical composition (Bakand *et al.*, 2012)]. For these two types of NP, similar effects and toxicological mechanisms have been reported (Oberdörster *et al.*, 2004) and similar tools may be used to characterize and quantify them in the workplace or in biological samples. Thus, for the sake of clarity, the term ‘nanoparticles’ is used here to refer to nanosized particles independently of their origins or aggregation status. Owing to an exponentially increased reactive surface, their chemical composition or their ability to adsorb toxins, the particular toxicity of NP has been largely demonstrated in experimental studies, including respiratory effects (Andujar *et al.*, 2011) and extra-pulmonary effects on cardiovascular, neurological, and immune systems (Ostiguy *et al.*, 2006). In humans, the toxicity of ultrafine fractions of particulate matter (atmospheric pollution) has been suggested in epidemiological studies demonstrating a greater incidence of pulmonary diseases (pneumonia, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cancer) or cardiovascular morbidity and mortality (Ostiguy *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008; Kendall *et al.*, 2012). It remains unclear whether these extra-pulmonary effects are related to extra-pulmonary translocation (Kendall *et al.*, 2012; Landsiedel *et al.*, 2012). For these reasons, the toxicokinetics of NP is a major subject of toxicological studies, especially given the intense development of nanomedicine (Card *et al.*, 2008; Arvizo *et al.*, 2010; Sa *et al.*, 2012). These studies provide methods and results that are potentially useful in the development of biological monitoring of environmental or workplace exposure to NP and in the diagnosis of diseases potentially related to these exposures.

The aim of this article is to review the methods related to the toxicokinetics of inhaled NP through biological barriers in animal and in human, to synthesize their results and to discuss the possibilities of developing biological monitoring of NP.

WHAT ARE THE NEEDS?

The exponential increase in the production and commercialization of nano-based products is a potential source of occupational or environmental exposure via respiratory, dermal, and oral routes. Inhalation is the most widely documented and probably the most significant exposure route for NP (Schmid *et al.*, 2009). These exposures have been suspected to cause adverse effects such as pulmonary effects (Khatri *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014), pulmonary diseases (Song *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2010), and allergic diseases (Journeay *et al.*, 2014). Other potential sources of exposure in humans are the various applications of NP in biomedicine such as superparamagnetic iron oxide NP, dendrimers, mesoporous silica NP, gold NP and carbon nanotubes (CNT; Kunzmann *et al.*, 2011). Occupational activities are also a possible source of exposure to unintentional NP. Welding is an example of human exposure to metallic NP such as manganese in a range of concentrations proven to induce an inflammatory response in inhalation studies in rodents (Elder *et al.*, 2006). Hereafter some case reports are summarized in which clinicians tried to characterize NP in human tissues.

One patient died from a respiratory distress syndrome after an acute exposure to nickel NP while spraying nickel in a metal arc process. High levels of nickel were found in his urine and kidney and NP less than 25 nm in diameter were detected in his alveolar macrophages (Rendall *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 2010). In two patients who died from pneumoconiosis after aluminum welding, scanning electron microscopy (SEM) revealed concentrations of aluminum particles from 8.5 to 11.2 billion particles per cm³ of lung tissue. Transmission electron microscopy (TEM) examination revealed that the particles were mostly aggregates of particles as small as 10 nm (Hull *et al.*, 2002). Seven young female Chinese workers suffered from shortness of breath, pleural effusion, and progressive pulmonary fibrosis after several months

of chronic exposure to polyacrylic ester spray-painting. NP were found by TEM in their chest fluid, pulmonary epithelial, and mesothelial cells suggesting regional pulmonary translocation. Although chemical characterization was not performed, polyacrylate NP were suspected to have caused the diseases (Song *et al.*, 2009). However, owing to limitations in the assessment of occupational exposure and a lack of information on the chemical composition of the NP, a consortium of nanotoxicologists challenged the causal link with the symptoms (Donaldson *et al.*, 2009). Subsequent research with TEM identified silica NP in alveolar macrophages, epithelial cells, and chest fluid. The authors suggested that nanosilica particles were used as additive in the polyacrylic ester spray-painting process (Song *et al.*, 2011). Similarly, in the case of a 58-year-old man who died from a bronchiolitis obliterans organizing pneumonia after a 3-months exposure to polyester powder paint, the presence of titanium dioxide NPs in both pulmonary sample and the paint was demonstrated with TEM (Cheng *et al.*, 2012).

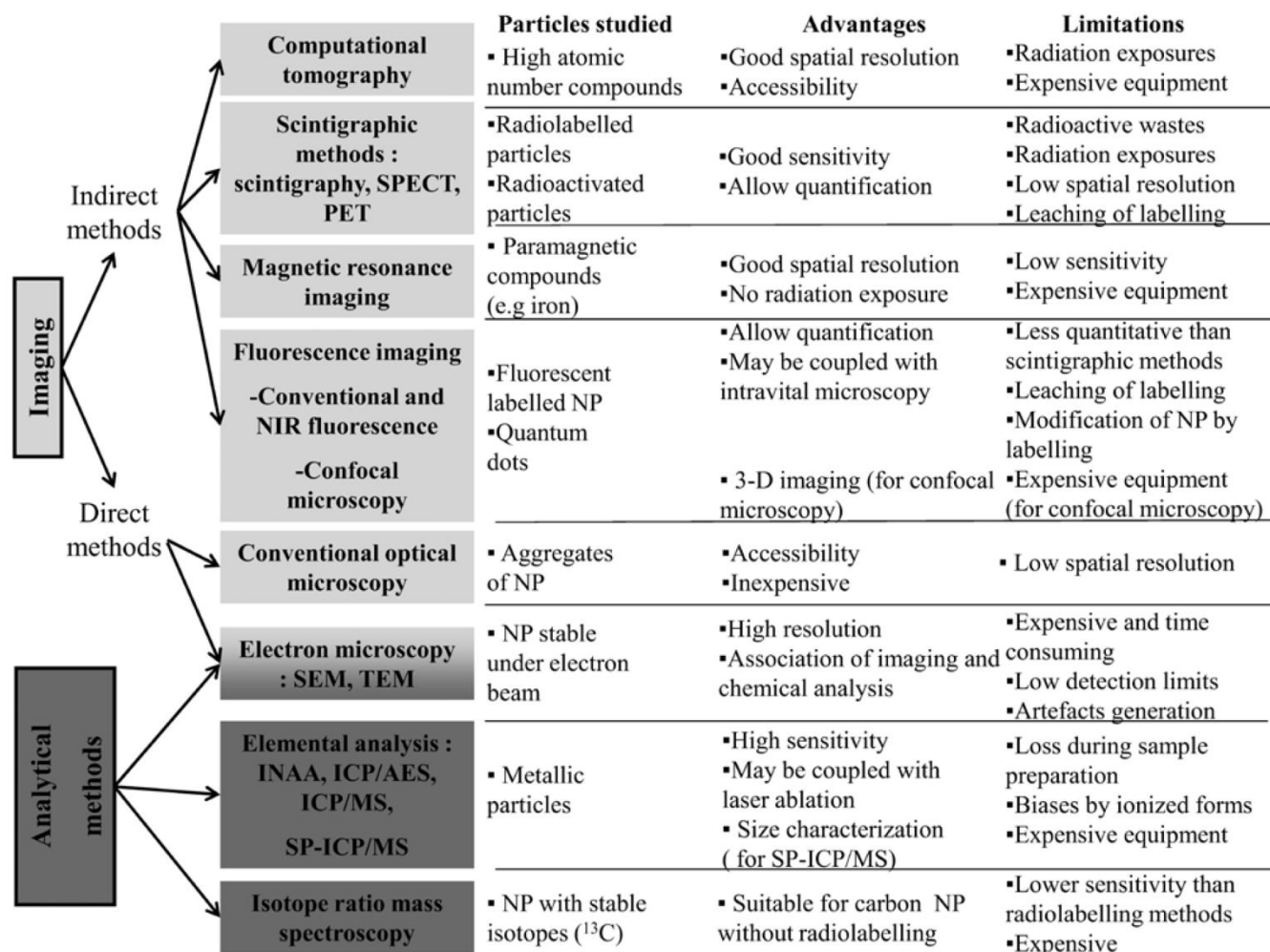
Submesothelial peritoneal deposition of carbon NP evidenced by electron microscopy and attributed to toner exposure has also been described, suggesting a possible systemic translocation after exposure by inhalation (Theegarten *et al.*, 2010). This translocation of carbon NP in humans can also be suspected in view of the black pigment found in the livers and spleens of coal workers in earlier studies, although electron microscopic confirmation of the finding is lacking (LeFevre *et al.*, 1982). Environmental exposures were also reported after the collapse of the World Trade Center. Seven patients followed up in the Mount Sinai World Trade Center medical monitoring program underwent lung biopsy during video-assisted thoracoscopy. CNT of various sizes and lengths were found in the lungs of four patients in concentrations ranging from 10 040 to 230 000 particles/g of wet lung. They were similar to those found in air samples (Wu *et al.*, 2010).

In these observations, presence of NP in tissues has been reported with electron microscopy although it was not always possible to conclude that there was a causal link with health effects. These sparse case reports highlight the need of an analysis of methods available to improve quantitative and qualitative characterization of NP in tissues.

WHICH TOOLS?

Biokinetic studies use high sensitivity and low background methods covering a range of several magnitudes (Kreyling *et al.*, 2013). The methods usually used in these studies are summarized in Fig. 1. To be useful in clinical purposes, biological monitoring should be based on reproducible preparations and analytical protocols adapted to the range of size of NP using available and rapid tools.

In the first publications on the topic of biological monitoring of NP, the first stage of the diagnosis was to confirm the presence of NP in lung tissues and in fluids such as bronchoalveolar lavage fluid (BALF) or pleural liquid (Song *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2010; Theegarten *et al.*, 2010) although more evidence than this is required to be able to conclude in a causal link with the symptoms. Given its availability and its utilization by pathologists, electron microscopy was usually used for this purpose. Conventional optical microscopy is a quicker and more economical method but allows only the detection of aggregates because of a spatial resolution of 200 nm. Near field scanning optical microscopy with a spatial resolution sometimes under 50 nm (Amarie *et al.*, 2012) is an interesting alternative but requires expensive equipment. These methods can be associated with other methods such as magnetic resonance imaging (MRI), computational tomography (CT) or positron emission tomography in multimodal or multifunctional imaging (Park *et al.*, 2012). Electron and scanning probe microscopes with resolutions in the sub-nanometer range are more suitable for the characterization and localization of NP in tissues. Moreover, analytical electron microscopy (energy dispersive X-ray spectroscopy or electron energy loss spectroscopy combined with TEM or SEM) allows the composition of elements heavier than beryllium to be determined. These high resolution methods are needed to characterize the size, distribution, shape, structure and chemical composition of nanomaterials especially in *in vivo* conditions for toxicological investigation (Bakand *et al.*, 2012). Their limitations are the following: the artifacts produced by the sample preparation needed to operate in a vacuum (Tiede *et al.*, 2008); their lack of sensitivity making them inadequate for translocation studies in which NP concentrations in peripheral organs may be lower than one particle per 1 mm² section (Tsutsumi *et al.*, 2011); and underestimation of size when the organic



1 Methods usually applied in toxicokinetics studies of NP (SPECT: Single photo emission computed tomography, PET: Positron emission tomography, NIR: Near infrared, INAA: Instrumental neutron activation analysis, ICP/MS: Inductively coupled plasma with mass spectroscopy, ICP/AES: Inductively coupled plasma with atomic emission spectroscopy).

coating is not visualized (Choi *et al.*, 2010). Probably owing to these limitations, there is no published quantitative characterization method using SEM or TEM (Hagens *et al.*, 2007).

Thus, quantification of NP may be based on quantitative methods already used by pharmacological or toxicological hospital laboratories. These methods are based on elemental analysis of the tissue by methods such as instrumental neutron activation analysis, inductively coupled plasma with mass spectroscopy (ICPMS), or atomic emission spectroscopy (Khlebtsov *et al.*, 2011). These methods have several limitations: a possible natural background of the element under study (Kreyling *et al.*, 2013), possible loss or contamination during sample preparation and misinterpretation due to NP dissolution, with diffusion or accumulation of the ionized forms (Geiser *et al.*, 2010). Indeed, several NP are soluble in various

physiological conditions (nanosilver, nanocopper, zinc and iron oxide NP, quantum dots) (Boyes *et al.*, 2012). Complex methods such as X-ray absorption spectroscopy are required to differentiate a particulate from an ionic form (Baek *et al.*, 2012). An alternative is to use a separation method such as sedimentation field-flow fractionation (Deering *et al.*, 2008) or hydrodynamic chromatography (Laborda *et al.*, 2014).

Moreover, standard elemental analysis of tissue does not provide any information on compartmental distribution (vascular, interstitial), which is crucial for tissue like the brain (De Jong *et al.*, 2008; Boyes *et al.*, 2012). These data can be obtained by coupling elemental analysis with laser ablation (Wang *et al.*, 2012; Koelmel *et al.*, 2013) or with electron microscopy (Deng *et al.*, 2007; Dziendzikowska *et al.*, 2012). A very promising method is single particle-ICPMS able to differentiate a particulate from an ionic form

and to provide information on elemental chemical composition, size, number concentration, and size distribution of NP in liquid samples. At present it is suitable particularly for noncarbon NP consisting of one element and sizes higher than 20 nm of diameter (Laborda *et al.*, 2014). Single particle-ICPMS has been efficiently used to analyze silver, gold or titanium NP in digested tissues (van der Zande *et al.*, 2012; Gray *et al.*, 2013; Tassinari *et al.*, 2014).

Other indirect methods have been proposed such as medical imaging methods. CT had been used to indirectly identify NP that exhibit high atomic numbers and absorption coefficient (gold) or NP conjugated with contrast agents such as iodine (Roller *et al.*, 2011) in human lung with a good spatial resolution. MRI had been also used to assess lung deposition of iron oxide NP (Carvalho *et al.*, 2011) or to detect the metal impurities of CNT (Al Faraj *et al.*, 2009).

WHICH SAMPLES?

Toxicokinetics studies are helpful to identify which biological fluid or tissue may be used in biometrology of NP.

In these studies, from 30 to 60% (Schmid *et al.*, 2009) of inhaled NP are deposited in the nasopharyngeal, tracheobronchial and even alveolar regions (Geiser *et al.*, 2010; Kreyling *et al.*, 2013). This deep deposition also demonstrated for aggregates like diesel exhaust particles (Broday *et al.*, 2011), implies a slower clearance and a higher probability of adverse health effects for NP (Bakand *et al.*, 2012).

After deposition, NP are cleared by chemical dissolution or physical translocation (Oberdörster *et al.*, 2004). In the alveolar region, phagocytic uptake by alveolar macrophages followed by dissolution or transport and accumulation in the lymphatic system lead to a half-life of 700 days in humans for micronic particles (Schmid *et al.*, 2009). Owing to less effective recognition and internalization in phagocytic cells, this clearance is thought to be about 5 (Schmid *et al.*, 2009) to 100-fold (Oberdörster *et al.*, 2004) less efficient for NP. Translocation of particles from the alveolar space to the pleural space is possible, followed by lymphatic drainage through the stomata of the parietal pleura where particles may accumulate and form macroscopic structures known as black spots (Donaldson *et al.*, 2010).

In the tracheobronchial airways, NP are transported by mucociliary clearance towards the larynx and

swallowed into the gastrointestinal tract. Penetration through the periciliary space and possible deposition in areas without mucus coverage may explain possible long-term retention (Kreyling *et al.*, 2013), resulting in their possible detection in BALF (Geiser *et al.*, 2010) or in exhaled breath condensate. Such samples provide an interesting noninvasive method to detect and quantify NP in lung (Sauvain *et al.*, 2014).

After interstitial translocation, NP can pass through the endothelial cells and be detected in the blood (Oberdörster *et al.*, 2004; Kreyling *et al.*, 2013). In blood, particles tend to be coated by different blood proteins promoting internalization (Kettiger *et al.*, 2013). Then they are rapidly (in a few minutes) cleared by the phagocytic cells of the mononuclear phagocyte system (MPS). Particles that are not captured by MPS cells can circulate longer and be carried out to the peripheral organs (Garnett *et al.*, 2006).

Intravenous administration studies have shown that major uptake occurs in the liver, followed by the spleen, lymph nodes and bone marrow, organs containing high levels of MPS cells and many other tissues in a smaller proportion such as lung, kidney, skin, and stomach.

Systemic translocation rate was found to be highly size-dependent (10-fold higher for 20 nm particles compared with 80 nm iridium particles, 40-fold higher for 1.4 nm gold particles compared with 18 nm) without a clear threshold and also depended on the agglomeration status of NP or their chemical composition (Geiser *et al.*, 2010). Translocation rate was found to be less than 5% for iridium particles (Geiser *et al.*, 2010) and lower than 20% for 20 nm polystyrene particles (Sarlo *et al.*, 2009). Schmid *et al.* estimated the total systemic accumulation of atmospheric ultrafine particles as 10^{11} during the lifetime of a human, thus four orders of magnitude below the lung dose (Schmid *et al.*, 2009).

A few data are available in humans based on scintigraphic studies with technegas inhalation. Some authors reported systemic translocation with liver or bladder accumulation (Nemmar *et al.*, 2002) whereas others did not, suggesting that positive results were at least to some extent related to the pertechnetate soluble fraction (Brown *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2006).

NP may also be detected in excreta like urine. Intravenous administration in rodents showed that urinary excretion following renal glomerular filtration

may occur in NP with a hydrodynamic diameter lower than 6 nm (Choi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Riviere *et al.*, 2009; Boyes *et al.*, 2012). This threshold is probably not relevant for fibrous NP such as CNT (length up to 2.5 μm , diameter 20 nm) which were reported to be efficiently excreted in urine (Singh *et al.*, 2006; Landsiedel *et al.*, 2012). Urinary excretion was also reported for spherical isolated or aggregated NP after respiratory exposure to 100 nm carbon particles (Wiebert *et al.*, 2006) or 26 nm iron oxide particles (Zhu *et al.*, 2009) and even after oral exposure to 25 or 80 nm zinc oxide (Lee *et al.*, 2012) particles. It was impossible in these studies to rule out the possibility that a dissolved form was excreted.

Detection of NP, swallowed after mucociliary clearance or cleared from the blood by hepatobiliary excretion (Hagens *et al.*, 2007; Oberdörster *et al.*, 2009) in feces could be possible but would be hindered by the presence of dietary particles. Indeed, the estimated intake of dietary inorganic particles is about 40 mg/person/day, which corresponds to a daily ingestion of 10^{12} – 10^{14} particles/person (Powell *et al.*, 2010). Moreover, swallowed NP may also be absorbed in gastrointestinal tract. Intestinal uptake of NP is possible by absorption via enterocytes, paracellular uptake (persorption) and uptake by microfold cells of Peyer's patches into the lymphatic and blood circulation (O'Hagan *et al.*, 1996; Oberdörster *et al.*, 2004). Reported uptake rates vary between 10 and 34% for particles under 100 nm, with great inter-individual variation (Fröhlich *et al.*, 2012).

In some studies, absence of fecal or urinary excretion was reported with a long-term accumulation confirmed for quantum dots (more than 133 days) or titanium dioxide NP (more than 182 days) (Landsiedel *et al.*, 2012).

Given these toxicokinetics data, inhaled NP might be detected in biological samples (BALF, exhaled condensate, blood, urine, feces) or in tissues (mainly in lung, pleura, liver, and spleen).

WHAT INITIAL DATA ARE AVAILABLE?

Once such particles have been identified and quantified, the clinician faces difficulties owing to the lack of reference values to interpret the data (Song *et al.*, 2009). This underlines the need for data obtained with validated methods in specific biological samples

(BALF, lung tissue, etc.) and in relevant groups of exposures.

Extrapolation of experimental studies to humans

Several interspecies differences have to be taken into account to extrapolate experimental results to humans, e.g. anatomical (monopodial branching structure and absence of respiratory bronchioles in rat) and physiological (rats are obligate nose breathers and have a higher lung clearance rate; Brown *et al.*, 2005; Kreyling *et al.*, 2006; Kreyling *et al.*, 2013). Moreover, laboratory inhalation and instillation studies do not efficiently simulate real-life exposure where complex mixtures in terms of size and chemical composition may affect deposition and clearance mechanisms (Brown *et al.*, 2005). Doses reached in experimental studies may be 100- to 1000-fold higher than doses in real exposure (Geiser *et al.*, 2010).

Applying the results of long-term kinetics studies in rats, Kreyling *et al.* estimated an accumulation of about 0.01–0.05% of each daily lung dose in the peripheral organs, corresponding to 4–20% of the daily deposited lung dose. Expressed as the number of particles, this means about 3×10^9 ultrafine particles deposited per day in the lung (3×10^{11} during 1 year) and 1 – 6×10^8 ultrafine particles that would have accumulated in each secondary target organ corresponding to a mass lower than 10 ng (Kreyling *et al.*, 2006).

Other extrapolations suggest that approximately 5×10^{12} atmospheric ultrafine particles are deposited daily in a human lung and 8×10^{11} natural NP are absorbed orally (Kendall *et al.*, 2012).

Initial data on quantification of NP in human tissue

Although it is still unclear whether NP will be a public health concern, there is a crucial need to develop methods to quantify NP in the environment and in human tissues (Kendall *et al.*, 2012), and data are still sparse.

The burden of particles in the lung results from the equilibrium between deposition and clearance mechanisms (Oberdörster *et al.*, 2004). Owing to the very slow clearance kinetics in humans and the declining clearance rates as retention time increases, Geiser *et al.* estimated that about 10 to 20% of insoluble NP will never be cleared in physiological conditions and probably more in high exposure settings such as tobacco smoking or occupational exposures (Geiser *et al.*, 2010).

To date, very little is known about the lung burden of fine and ultrafine particles. Data are often limited to coarse fibrous or non-fibrous mineral particles involved in pneumoconiosis or lung cancer such as asbestos, silica and beryllium particles. Although the following publications are not restricted to NP, they provide some initial information on human lung content in NP. Environmental exposure to ultrafine particles is suggested by the presence of carbonaceous particles in macrophages of BALF in adults as revealed by analytical electron microscopy (Hauser *et al.*, 2001). The presence of the carbonaceous particles in alveolar macrophages obtained in children by sputum induction or BALF and assessed by optical microscopy has also been correlated with environmental exposure to ultrafine particles related to traffic pollution (Bunn *et al.*, 2001) and industrial areas (Kalappanavar *et al.*, 2012), with an inverse, dose-dependent association with lung function parameters (Kulkarni *et al.*, 2006). Using SEM to assess lung sections from autopsies obtained during the 1952 London smog, Hunt *et al.* showed the presence of retained soot (ultrafine carbonaceous aggregates) and fine ($<1\ \mu\text{m}$) metallic particles (Hunt *et al.*, 2003). Quantitative analyses were not performed especially because of the small volume analyzed and because of the low sensitivity for differentiating carbonaceous particles from carbonaceous tissues (Bunn *et al.*, 2001). Churg *et al.* published several studies on the contents of autopsied lung in non-smoker residents of a low polluted city (Vancouver) compared to a highly polluted city (Mexico City) using bleach digestion of samples and a combination of ultracentrifugation and filtration methods with TEM analysis. Although there was great inter-individual variability, they found both quantitative and qualitative differences. They found mean particle concentrations in Mexico City residents that were significantly higher than in residents of Vancouver (respectively 2.05×10^9 and 0.28×10^9 particles/g of dry lung). In the lung samples from Mexico City, 25% of particles were carbonaceous aggregates of ultrafine particles similar to the combustion-derived particles observed in air samples, whereas they were rarely observed in lungs in Vancouver. These authors surprisingly found a relative lack of accumulation of ultrafine particles compared with the published data of deposition, so they concluded that clearance was rapid (Churg *et al.*, 1997; Churg *et al.*, 2000; Brauer *et al.*, 2001). Since

several biases are possible, these results remain to be confirmed. However, future comparisons may prove to be difficult because of the lack a normalized method of sample preparation, counting rules, and particle classification. Moreover, in all these publications, results were expressed as numeric concentrations of NP although in experimental studies, biological effects like inflammation, histological effects, genotoxicity, and carcinogenicity are better correlated with dose expressed as surface area (Kendall *et al.*, 2012).

It remains unclear whether translocation may explain the extrapulmonary effects of NP. Indeed, adverse effects and translocation may also be due to water-soluble components of the particles, as shown for combustion-derived NP in rats (Wallenborn *et al.*, 2007). To date, there is no clear evidence of the presence of inhaled or ingested NP in human peripheral organs, contrary to evidence for coarse particles such as coal particles (Wu *et al.*, 2010), silica or asbestos fibers. Indeed, despite their length exceeding several microns, asbestos fibers have been found in several peripheral organs such as the kidney, heart, liver, spleen (Auerbach *et al.*, 1980) and even in fetal lung, liver, muscle, and placental tissues (Haque *et al.*, 1998).

Microsized and nanosized particles of various compositions (metallic, ceramic material) have also been reported in blood and several tissues like liver, kidney, spleen, and fetal tissues by using SEM. However, in these publications, the lack of quantitative data and complete chemical characterization meant that it was not possible to draw conclusion about the sources of these particles (Gatti *et al.*, 2004; Gatti *et al.*, 2011).

An overview of the publications related to NP identification and quantification in tissue or extrapulmonary translocation in human is presented in Table 1.

CONCLUSION

The intensive development of nanotechnology and NP-containing commercial products whose detrimental health effects are being increasingly suggested by experimental and epidemiologic studies is of great concern. In most first case report, clinicians may face difficulties because of the lack of a standardized method to analyze the NP content in tissues or to compare their results to reference values. The present review synthesizes published data concerning the potential usefulness of the biological monitoring of NP for clinical purposes.

Table 1. Summary of publications related with NP deposition, translocation, identification or quantification in human tissue (Exp.study: experimental study, CPOD: chronic pulmonary obstructive disease)

nr	Type	Particles	Size	Material-methods	Main results	Ref.
111	Autopsic series	Various metallic particles	—	Analytical SEM analyses of liver and kidney tissues of 16 fetuses.	NP (metals and heavy metals) found in liver and kidney.	Gatti <i>et al.</i> (2011)
111	Autopsic series	All particles retained in lung	—	TEM analyses of digested and microfiltrated or ultracentrifugated lung samples.	Higher particles concentration in the Mexico city lungs with 25% of carbonaceous aggregates.	Chung <i>et al.</i> (2000) and Brauer <i>et al.</i> (2001)
117	Autopsic series	All particles retained in lung	—	SEM analyses of Lung sections from autopsies achieved during the 1952 London Smog.	Presence of retained ultrafine carbonaceous aggregates and fine metallic particles (<1 µm) in lung.	Hunt <i>et al.</i> (2003)
110	Case report	Carbon NP	30–70 nm aggregates	SEM–TEM tissue analyses of black spots revealed in peritoneum by laparoscopy performed for diarrhea.	Confirmation of submesothelial deposition of carbon NP suggesting systemic translocation after toner exposure.	Theegarten <i>et al.</i> (2010)
109	Case report	Silica	2–20 nm	Retrospective exposure assessment in the workplace and SEM–TEM analyses following seven cases of pulmonary diseases after occupational exposure to spray paint.	30 nm polycrylate NP found in dust and material at the workplace. 20 nm Silica NPs found in alveolar macrophages, epithelial cells, and chest fluids.	Song <i>et al.</i> (2009) and Song <i>et al.</i> (2011)
109	Case report	CNT	Various length	TEM mineralogic studies of lung on seven cases after exposure to World Trade Center dust.	Confirmation of presence of CNT in lung samples of four patients in concentration ranging 11 000 to 230 000/g of wet lung.	Wu <i>et al.</i> (2010)
104	Case report	Various metallic particles	—	Analytical SEM analyses of 16 samples of biological material adherent to vena cave filter explanted.	Various foreign bodies, in some cases nanosized with various non-biocompatible elements (lead, bismuth, tungsten).	Gatti <i>et al.</i> (2011)

Table 1. Continued

Year	Type	Particles	Size	Material-methods	Main results	Ref.
2002	Case report	Aluminum NP	340 nm aggregates of NP as small as 10 nm	Analytical SEM and TEM analyses of lung of two patients died from pneumoconiosis after aluminum welding.	Concentration from 8.5 to 11.2 billion aggregates of aluminum NP/cm ³ lung tissue.	Hull and Abraham (2002)
1994	Case report	Nickel NP	Aggregates and primary 50 nm particles	Exposure assessment in the workplace and SEM-TEM analyses following the death of a 38-year patient after a 90-min operating a metal arc process for spraying nickel.	Presence of 4–2.5 nm nickel particles in alveolar macrophages, elevation by a magnitude of nickel in urine patient probably related to translocation.	Phillips <i>et al.</i> (2010) and Rendall <i>et al.</i> (1994)
2001	Case report	Carbon NP	—	TEM analyses of macrophages isolated from 14 healthy nonsmokers BALF.	Demonstration of ultrafine carbonaceous particles in all subjects suggesting environmental exposure.	Hauser <i>et al.</i> , 2001
2006	Experimental study	Technegas: ^{99m} Tc labeled carbon NP	108 nm aggregates of 4–21 nm primary particles	Inhalation study conducted on 10 healthy volunteers. Retention followed by scintigraphy.	No radioactivity detected in liver or spleen. Radioactivity in blood and urine related to unbound ^{99m} Tc-pertechnetate.	Mills <i>et al.</i> (2006)
2006	Experimental study	Technegas: ^{99m} Tc labeled carbon NP	98 nm aggregates	Inhalation study conducted on six nonsmokers, four healthy smokers, five asthmatics. Retention monitored by scintigraphy.	No evidence of an important translocation of 100 nm to systemic circulation.	Wiebert <i>et al.</i> (2006)
2002	Experimental study	Technegas: ^{99m} Tc labeled carbon NP	61 nm aggregates of 21 nm primary particles	Inhalation study on 10 patients with CPOD and nine controls. Retention monitored by scintigraphy.	Higher deposition in patients. No extrapulmonary translocation.	Brown <i>et al.</i> (2002)
2002	Experimental study	Technegas: ^{99m} Tc labeled carbon NP	<100 nm aggregates of 5–10 primary particles	Inhalation study conducted on 10 healthy volunteers. Retention monitored by scintigraphy.	Ultrafine carbon NP pass rapidly into systemic circulation with accumulation in liver.	Nemmar <i>et al.</i> (2002)

Toxicokinetic studies on NP suggest that they may preferentially enter by respiratory and oral routes with possible systemic translocation, leading to accumulation in the peripheral organs or excretion in feces or urine. These studies provide useful methods for the biological monitoring of NP both in terms of the retrospective evaluation of exposure and in the follow-up of occupational exposure in the workplace. Studies are now needed to assess the feasibility and relevance of quantifying NP in biological samples such as blood and urine for assessing occupational exposure, or in BALF or lung samples when NP are suspected of being responsible for lung disease. The biological monitoring of NP should be based on imaging methods such as electron microscopy, which are essential to confirm their presence and characterize their morphology and chemical composition in tissue. If quantitative data are required (ubiquitous particles), analytical quantitative methods such as inductively coupled plasma with atomic emission spectroscopy or ICPMS may complete these analyses. Single particle-ICPMS is also a promising method which allows to provide information on chemical and size characterization. There is an urgent need to develop standardized methods for the preparation and analysis of samples in order to quantify NP and define reference values.

FUNDING

This review was written in the framework of the NANOTRANS study funded by Anses—French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (EST 09-85); the CHU de Bordeaux (OBX 2008/04); and the Regional Council of Aquitaine (convention 201013010007).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the SERENADE LABEX (11-LABX-0064) (stands for Safe(r) Ecodesign Research and Education applied to NAnomaterial DEvelopment) for their helpful comments about biological monitoring of inhaled nanoparticles and Ray Cooke for his careful reading of the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Al Faraj A, Cieslar K, Lacroix G *et al.* (2009) In vivo imaging of carbon nanotube biodistribution using magnetic resonance imaging. *Nano Lett*; 9:1023–7.
- Amarie S, Zaslansky P, Kajihara Y *et al.* (2012) Nano-FTIR chemical mapping of minerals in biological materials. *Beilstein J Nanotechnol*; 3: 312–23.
- Andujar P, Lanone S, Brochard P *et al.* (2011) Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev Mal Respir*; 28: e66–75.
- Arvizo R, Bhattacharya R, Mukherjee P. (2010) Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opin Drug Deliv*; 7: 753–63.
- Auerbach O, Conston AS, Garfinkel L *et al.* (1980) Presence of asbestos bodies in organs other than the lung. *Chest*; 77: 133–7.
- Baek M, Chung HE, Yu J *et al.* (2012) Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*; 7: 3081–97.
- Bakand S, Hayes A, Dechsakulthorn F. (2012) Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol*; 24: 125–35.
- Boyes WK, Chen R, Chen C *et al.* (2012) The neurotoxic potential of engineered nanomaterials. *Neurotoxicology*; 33: 902–10.
- Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI *et al.* (2001) Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect*; 109: 1039–43.
- Brodady DM, Rosenzweig R. (2011) Deposition of fractal-like soot aggregates in the human respiratory tract. *Journal of Aerosol Science*; 42: 372–86.
- Brown JS, Wilson WE, Grant LD. (2005) Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. *Inhal Toxicol*; 17: 355–85.
- Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. (2002) Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med*; 166: 1240–7.
- Bunn HJ, Dinsdale D, Smith T *et al.* (2001) Ultrafine particles in alveolar macrophages from normal children. *Thorax*; 56: 932–4.
- Card JW, Zeldin DC, Bonner JC *et al.* (2008) Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 295: L400–11.
- Carvalho TC, Peters JI, Williams RO III. (2011) Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there? *Int J Pharm*; 406: 1–10.
- Cheng TH, Ko FC, Chang JL *et al.* (2012) Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia due to titanium nanoparticles in paint. *Ann Thorac Surg*; 93: 666–9.
- Choi HS, Ashitate Y, Lee JH *et al.* (2010) Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol*; 28: 1300–3.
- Choi HS, Liu W, Misra P *et al.* (2007) Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol*; 25: 1165–70.
- Churg A, Brauer M. (1997) Human lung parenchyma retains PM_{2.5}. *Am J Respir Crit Care Med*; 155: 2109–11.
- Churg A, Brauer M. (2000) Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol*; 24: 353–61.

- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P *et al.* (2008) Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*; 29: 1912–9.
- Deering CE, Tadjiki S, Assemi S *et al.* (2008) A novel method to detect unlabeled inorganic nanoparticles and submicron particles in tissue by sedimentation field-flow fractionation. *Part Fibre Toxicol*; 5: 18.
- Deng X, Jia G, Wang H *et al.* (2007) Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon*; 45: 1419–24.
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R *et al.* (2010) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*; 7: 5.
- Donaldson K, Oberdörster G, Ichihara G *et al.* (2009) Nanoparticles—one word: a multiplicity of different hazards. *Nanotoxicology*; 3: 263–64.
- Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A *et al.* (2012) Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J Appl Toxicol*; 32: 920–8.
- Elder A, Gelein R, Silva V *et al.* (2006) Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect*; 114: 1172–8. Erratum in: (2006) *Environ Health Perspect*; 114(8):1178.
- Fröhlich E, Roblegg E. (2012) Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*; 291: 10–7.
- Garnett MC, Kallinteri P. (2006) Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med (Lond)*; 56: 307–11.
- Gatti AM, Bosco P, Rivasi F *et al.* (2011) Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues. *Front Biosci (Elite Ed)*; 3: 221–6.
- Gatti AM, Montanari S, Monari E *et al.* (2004) Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. *J Mater Sci Mater Med*; 15: 469–72.
- Geiser M, Kreyling WG. (2010) Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*; 7: 2.
- Gray EP, Coleman JG, Bednar AJ *et al.* (2013) Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ Sci Technol*; 47: 14315–23.
- Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH *et al.* (2007) What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol*; 49: 217–29.
- Haque AK, Vrazel DM, Uchida T. (1998) Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas. *Arch Environ Contam Toxicol*; 35: 532–8.
- Hauser R, Godleski JJ, Hatch V *et al.* (2001) Ultrafine particles in human lung macrophages. *Arch Environ Health*; 56: 150–6.
- Hull MJ, Abraham JL. (2002) Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis. *Hum Pathol*; 33: 819–25.
- Hunt A, Abraham JL, Judson B *et al.* (2003) Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. *Environ Health Perspect*; 111: 1209–14.
- ISO. (2011) *ISO/TS 80004-4:2011. Nanotechnologies—Vocabulary—Part 4: Nanostructured materials*. CH1214 Vernier, Genève Suisse: ISO.
- Journey WS, Goldman RH. (2014) Occupational handling of nickel nanoparticles: a case report. *Am J Ind Med*; 57: 1073–6.
- Kalappanavar NK, Vinodkumar CS, Gouli C *et al.* (2012) Carbon particles in airway macrophage as a surrogate marker in the early detection of lung diseases. *Int J Occup Environ Med*; 3: 68–75.
- Kendall M, Holgate S. (2012) Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung. *Respirology*; 17: 743–58.
- Kettiger H, Schipanski A, Wick P *et al.* (2013) Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *Int J Nanomedicine*; 8: 3255–69.
- Khatrri M, Bello D, Gaines P *et al.* (2013) Nanoparticles from photocopiers induce oxidative stress and upper respiratory tract inflammation in healthy volunteers. *Nanotoxicology*; 7: 1014–27.
- Khlebtsov N, Dykman L. (2011) Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev*; 40: 1647–71.
- Koelmel J, Leland T, Wang H *et al.* (2013) Investigation of gold nanoparticles uptake and their tissue level distribution in rice plants by laser ablation-inductively coupled-mass spectrometry. *Environ Pollut*; 174: 222–8.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W. (2006) Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med*; 19: 74–83.
- Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S *et al.* (2013) Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res*; 46: 714–22.
- Kulkarni N, Pierse N, Rushton L *et al.* (2006) Carbon in airway macrophages and lung function in children. *N Engl J Med*; 355: 21–30.
- Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T *et al.* (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta*; 1810: 361–73.
- Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. (2014) Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem*; 86: 2270–78
- Landsiedel R, Fabian E, Ma-Hock L *et al.* (2012) Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol*; 86: 1021–60.
- Lee CM, Jeong HJ, Yun KN *et al.* (2012) Optical imaging to trace near infrared fluorescent zinc oxide nanoparticles following oral exposure. *Int J Nanomedicine*; 7: 3203–9.
- LeFevre ME, Green FH, Joel DD *et al.* (1982) Frequency of black pigment in livers and spleens of coal workers:

- correlation with pulmonary pathology and occupational information. *Hum Pathol*; 13: 1121–6.
- Li SD, Huang L. (2008) Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol Pharm*; 5: 496–504.
- Mills NL, Amin N, Robinson SD *et al.* (2006) Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med*; 173: 426–31.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B *et al.* (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*; 105: 411–4.
- Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. (2009) Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J Nanosci Nanotechnol*; 9: 4996–5007.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V *et al.* (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*; 16: 437–45.
- O'Hagan DT. (1996) The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *J Anat*; 189: 477–82.
- Ostiguy C, Lapointe G, Ménard L *et al.* (2006) *Nanoparticles. Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures. Studies and Research Projects/ Report R-470.* Montréal, Canada: IRSST. pp. 100.
- Park CW, Rhee YS, Vogt FG, *et al.* (2012) Advances in microscopy and complementary imaging techniques to assess the fate of drugs *ex vivo* in respiratory drug delivery: an invited paper. *Adv Drug Deliv Rev*; 64:344–56.
- Phillips JI, Green FY, Davies JC *et al.* (2010) Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles. *Am J Ind Med*; 53: 763–7.
- Powell JJ, Faria N, Thomas-McKay E *et al.* (2010) Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun*; 34: J226–33.
- Rendall RE, Phillips JI, Renton KA. (1994) Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process. *Ann Occup Hyg*; 38: 921–30.
- Riviere JE. (2009) Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*; 1: 26–34.
- Roller J, Laschke MW, Tschernig T, *et al.* (2011) How to detect a dwarf: *in vivo* imaging of nanoparticles in the lung. *Nanomedicine*; 7: 753–62.
- Sa LT, Albernaz Mde S, Patricio BF *et al.* (2012) Biodistribution of nanoparticles: initial considerations. *J Pharm Biomed Anal*; 70: 602–4.
- Sarlo K, Blackburn KL, Clark ED *et al.* (2009) Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat. *Toxicology*; 263: 117–26.
- Sauvain JJ, Sánchez Sandoval Hohl M, Wild P *et al.* (2014) Exhaled Breath Condensate as a Matrix for Combustion-Based Nanoparticle Exposure and Health Effect Evaluation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*; 27: 449–58.
- Schmid O, Möller W, Semmler-Behnke M *et al.* (2009) Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers*; 14 (Suppl 1): 67–73.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L *et al.* (2006) Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103: 3357–62.
- Song Y, Li X, Du X. (2009) Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J*; 34: 559–67.
- Song Y, Li X, Wang L *et al.* (2011) Nanomaterials in humans: identification, characteristics, and potential damage. *Toxicol Pathol*; 39: 841–9.
- Tassinari R, Cubadda F, Moracci G *et al.* (2014) Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology*; 8: 654–62.
- Theegarten D, Boukercha S, Philippou S *et al.* (2010) Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report. *Diagn Pathol*; 5: 77.
- Tiede K, Boxall AB, Tear SP *et al.* (2008) Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*; 25: 795–821.
- Tsutsumi Y, Yoshioka Y. (2011) Quantifying the biodistribution of nanoparticles. *Nat Nanotechnol*; 6: 755.
- van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E *et al.* (2012) Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*; 6: 7427–42.
- Wang T, Hsieh H, Hsieh Y *et al.* (2012) The *in vivo* biodistribution and fate of CdSe quantum dots in the murine model: a laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study. *Anal Bioanal Chem*; 404: 3025–36.
- Wallenborn JG, McGee JK, Schladweiler MC *et al.* (2007) Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. *Toxicol Sci*; 98: 231–9.
- Wiebert P, Sanchez-Crespo A, Seitz J *et al.* (2006) Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *Eur Respir J*; 28: 286–90.
- Wu M, Gordon RE, Herbert R *et al.* (2010) Case report: Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nanotubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples. *Environ Health Perspect*; 118: 499–504.
- Wu WT, Liao HY, Chung YT *et al.* (2014) Effect of nanoparticles exposure on fractional exhaled nitric oxide (FENO) in workers exposed to nanomaterials. *Int J Mol Sci*; 15: 878–94.
- Yang W, Peters JI, Williams RO III. (2008) Inhaled nanoparticles—a current review. *Int J Pharm*; 356: 239–47.
- Zhu MT, Feng WY, Wang Y *et al.* (2009) Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol Sci*; 107: 242–51.

Rinaldo Mickael

De: em.iaoe.0.461e7d.b851da06@editorialmanager.com de la part de The Editors at IAOEH [em@editorialmanager.com]
Envoyé: dimanche 27 septembre 2015 20:15
À: Rinaldo Mickael
Objet: Submission Confirmation

Dear Dr. Rinaldo,

Thank you for submitting your manuscript, "Nanosized particles in fetal lung tissues", to International Archives of Occupational and Environmental Health.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://iaoe.edmgr.com/>

Your username is: mickael.rinaldo@chuv.ch Your password is: available at this link http://iaoe.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Micka%3%abl&lastname=Rinaldo&email_address=mickael.rinaldo@chuv.ch

We will also need to receive a signed copyright transfer form from you. As soon as your manuscript is finally accepted you will receive further notification from our production department.

Please note:

- Submission of a manuscript implies and it shall be stated that the work described has not been published before, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.
- Each paper must be preceded by a structured abstract (150-250 words, objectives, methods, results, conclusions).
- Immediately following the Abstract no more than 4 to 6 key words are to be supplied for subject indexing.
- As an appendix to the text one or more statements should specify acknowledgements (for details please refer to Instructions for Authors, Manuscript preparation, Item 6).
- All references cited in the text, but only those, are to be listed at the end of the paper in alphabetical order under the first authors name (for details please refer to Instructions for Authors, Manuscript preparation, Item 9).

Moreover, please refer to the Instructions for Authors at www.springerlink.com. Thank you very much in advance.

Best regards,
Journals Editorial Office

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to

Nanosized particles in fetal lung tissues

Mickael Rinaldo^{a-d}, Aude Lacourt^{c,d}, Robert Saura^{b,c}, Gwenaelle André^b, Pascal Andujar^{e-g}, Sabyne Audignon^{c,d}, Dominique Carles^b, Dominique Dallay^{b,c}, Pierre Yves Guernion^h, Jacques Horovitz^{b,c}, Xavier Jansonⁱ, Fanny Pelluard^b, Elisabeth Sellier^j, Laurent Martinonⁱ, Patrick Brochard^{b-d}

^aInstitut universitaire romand de Santé au Travail, Lausanne Suisse, ^bCHU de Bordeaux, Bordeaux France, ^cUniversité de Bordeaux, F-33000 Bordeaux France, ^dINSERM, U897 Bordeaux France, ^eINSERM, U955, Equipe 4, Créteil, France; ^fUniversité Paris-Est Créteil, Faculté de Médecine, Créteil, France; ^gCentre Hospitalier Intercommunal Créteil, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil France, ^hAIRAQ, Bordeaux France, ⁱLaboratoire d'étude des particules inhalées de la Ville de Paris, Paris France, ^jCremem-Placamat UMS 3626 87, Avenue Schweitzer, Pessac France.

CORRESPONDING AUTHOR

Name: Mickael RINALDO

Postal address: Institut universitaire romand de Santé au Travail Route de la Corniche 2
CH-1066 Epalinges-Lausanne

E-mail: mickael.rinaldo@chuv.ch

Tel: 00 41 21 314 74 21 Fax: 00 41 21 314 74 30

NUMBER OF WORDS: 6327

Abbreviations

EDX: Energy dispersive X-ray analysis

SD: Standard deviation

TEM: Transmission electron microscopy

Abstract (186 words)

Purpose: Possible placental transfer of nanosized particles has been suggested by experimental studies but there is a lack of quantitative data on fetal exposure in humans. We aimed to investigate the presence of exogenous nanoparticles in fetal lung tissue, and to evaluate whether it was correlated with maternal exposure to particles.

Methods: We used analytical transmission electron microscopy to characterize particles contained in 30 human fetal lung samples after pregnancy termination. The correlation between sample content particles and maternal exposure particles (retrospectively assessed by a questionnaire) was studied.

Results: Particles were found in 23 samples at concentrations varying between 2.8 and 43.8 x 10⁶/g. Particles were mainly aggregates of nanosized particles (73.4% of total). Most of the particles (72.6%) were composed of metals such as iron, titanium, iron-chromium-nickel alloy (stainless steel) and alumina. There was a significant correlation between maternal smoking status and carbonaceous particle concentration. The results also suggest a possible correlation between exposure to pollution and metallic particle concentrations.

Conclusions: Further research is needed to determine whether the transfer of particles across the human placental barrier identified in our study is of toxicological importance.

KEY WORDS

Nanoparticles, ultrafine particles, translocation, placental transfer, transmission electron microscopy, *in utero* exposure

1. Introduction

Human exposure to nanosized particles may result from exposure to unintentionally produced ultrafine particles such as tobacco smoke or diesel particles, or from the increasing production of commercial nanoparticles, in particular in nanomedicine. A growing body of epidemiological evidence suggests that prenatal exposure to particulate matter from pollution is associated with adverse pregnancy outcomes such as low birth weight, pre-term birth and increased respiratory-related infant morbidity and mortality (Backes et al. 2013; Stieb et al. 2012). The existing literature indicates that pregnancy outcomes may be explained by the cardiovascular mechanisms of oxidative stress, inflammation, coagulation, endothelial function and hemodynamic responses resulting in the alteration of transplacental oxygen and nutrient transport (Kannan et al. 2006). Diesel exhaust particles are the most common combustion-derived nanoparticles. They are thought to be responsible for several health effects after prenatal exposure including changes in growth, sexual development, behavior, susceptibility to allergies, inflammatory and genotoxic outcomes (Ema et al. 2013; Li et al. 2013).

Despite limitations related to the variance in the route of exposure and doses in animal studies, similar effects have been found with manufactured nanomaterials (Balansky et al. 2013; Blum et al. 2012; Campagnolo et al. 2013; Ghaderi et al. 2015; Hong et al. 2014; Jackson et al. 2012; Takahashi et al. 2010; Wu et al. 2015; Yoshida et al. 2010). For example, maternal pulmonary exposure to carbon nanoparticles (Printex 90) may induce liver DNA damage in offspring (Jackson et al. 2012) or may impact development of the nervous system (Jackson et al. 2011). These adverse effects of maternal exposure to nanoparticles on the embryo/fetus may manifest only later in life, with proven effects on male reproductive, nervous, immune, and cardiovascular systems (Hougaard et al. 2015). Experimental data suggest that the fetus may be affected either directly by particle translocation through the placenta, by altered placental function, or indirectly by circulating cytokines or other secondary messengers from an inflammatory process in the mother (Ema et al. 2010; Hougaard et al. 2011). Nanosized particles have a much greater biodistribution and longer circulation time with increased access to the peripheral organs (Almeida et al. 2011; Landsiedel et al. 2012). This ability to reach the peripheral organs, and potentially the fetus, creates concerns about their potential toxicity at the assumed exposure levels in humans (Pietrojusti, Campagnolo, and Fadeel 2013), also suggesting huge potential impact in the development of nanomedicine (Menezes, Malek, and Keelan 2011).

The placental transfer of particles can be evaluated by *in vitro* placental cell line models (Mathiesen et al. 2014), *in vivo* models and *ex-vivo* human placental models (Saunders 2009). Since the placenta is one of the most species-specific mammalian organs, extrapolation of animal studies to humans is difficult. The *ex-vivo* human placenta model only allows 4 to 8h of experimentation, which is sufficient to study bidirectional transport and short time effects but not chronic effects (Buerki-Thurnherr, von Mandach, and Wick 2012) nor transport rate at early gestational ages when the barrier is thicker (Grafmuller et al. 2013). However, despite these limitations, the evidence suggests that the placenta may be permeable to nanoparticles and particles up to 500 nm (Kulvietis et al. 2011). Fine or ultrafine particles present in maternal blood due to maternal exposure to manufactured nanoparticles or unintentionally-produced particles (such as combustion-derived ultrafine particles) may thus potentially be transmitted to fetal blood and tissue.

The aim of the present study is to investigate the presence of exogenous nanoparticles in fetal lung tissue and to evaluate whether it is correlated with maternal exposure to particles. As similar effects and toxicological mechanisms have been reported between manufactured nanoparticles or unintentionally-produced ultrafine particles (Bakand, Hayes, and Dechsakulthorn 2012; Oberdorster et al. 2004), the term nanosized particle will refer to ‘nanoparticles’ independently of their origins or aggregation status.

2. Material and methods

2.1. The study

This observational study was performed in the obstetrics and gynecology departments of the University Hospital in Bordeaux between August 2009 and August 2013. All patients in the service having a pregnancy termination for pathological reasons after at least 20 weeks of gestation and a fetal autopsy were approached to participate in the study. After each patient gave informed consent agreeing to participate, a standardized questionnaire was administered by a physician to collect information about medical and obstetric history, current occupation, current residence and smoking status. During the fetal autopsy, a lung sample was collected in a sterile vial, frozen and kept at -80 °C until sample preparation. All samples were collected in the same laboratory room by the same team of pathologists.

Information about placental and fetal conditions was extracted from the autopsy report. Exclusion criteria were medical termination of pregnancy for maternal indication or exogenous etiologies (e.g. infectious disease, intoxication).

In accordance with French law, the study protocol was approved by the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer III) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

2.2. Samples preparation

All reactive agents were filtered with a 0.2- μm filter and all equipment was rinsed with ultrapure water before utilization. Before preparation, samples were fixed in a filtered 10% formalin solution for 24h. Lung samples were rinsed with ultrapure water to remove formalin and then divided into two samples: the first sample weighing approximately 300 mg was prepared by a digestion/filtration procedure and the second sample was weighed and desiccated for 24h in order to calculate the wet weight/dry weight ratio.

The first sample was placed in a 25 mL Erlenmeyer flask with 10 mL of concentrated sodium hypochlorite and agitated by an orbital agitator for 1 h. The suspension was then filtered by suction in a Pyrex microanalysis device (Millipore) using a pre-carbonated 37 mm polycarbonate filter with a pore size of 0.2 μm (Whatman).

After filtration and drying, the filter was carbon-coated with a carbon evaporator. The particles trapped between the two layers of carbon were then transferred to a transmission electron microscopy (TEM) copper indexed 200 mesh grid. A piece of filter was deposited on two grids placed on a Whatman filter paper imbibed with 2 mL chloroform in a closed Petri dish until total evaporation to dissolve the polycarbonate filter.

Samples were prepared in series of 3 or 6 samples. For each series a blank was performed within the same conditions and with the same reagent, and then analyzed with the same TEM protocol to rule out a contamination and to take in account the background.

2.3. TEM analysis

The grids were analyzed under a transmission electron microscope (JEOL 2010 LaB6) equipped with an energy-dispersive X-Ray analysis (EDX) system (IDFix 12.2.1, SAM'X).

This EDX microanalysis system collects the X-rays generated by the interaction between the surface of the sample and the electron beam, then sorts and plots them by energy in order to produce a spectrum in which elements with an atomic number greater than boron are detected. EDX analyses were conducted at an accelerating voltage of 200 kv, 7° tilt angle using collection times of 60-200 s.

The grid was first examined at low magnitude between x80 and x1000 to check quality and uniformity. Then, five grid openings were examined at x30k to x100k. Each particle found was classified according to its morphology (individual particles, aggregates, fibers),

photographed, analyzed by EDX and the spectrum was saved. The morphology and the spectrum made it possible to classify the particles with regard to their chemical composition as mineral particles (silica, silicate), metallic particles or carbonaceous particles.

The images were analyzed with Image J 1.43u software (NIH, USA). Briefly, each particle was contoured with a Bamboo Pen tablet (WACOM) to calculate its surface and diameter (ferret diameter). TEM analysis can be used to calculate particulate retention expressed either as a numerical concentration or as developed surface per unit of dry weight (particles/g or mm^2/g). Global concentration and concentration per morphologic class and chemical composition were calculated after deduction of blank contamination.

2.4. Assessment of maternal exposure to particles

Occupational exposure to ultrafine particles was assessed by an industrial hygienist. The probability of exposure exceeding the environmental background on a four-point scale was assigned to the current occupation and the current industry (0: no exposure, 1: possible exposure, 2: probable exposure, 3: very probable exposure). For each occupation or industry with a non-null probability, the type of particle was specified (metallic, mineral, carbonaceous, and organic).

Environmental exposure was assessed by geocoding current residence in collaboration with AIRAQ, the regional air quality watchdog association. Geocoding was used to classify place of residence as urban or rural (according to data from Institut National de la Statistique et des Études Économiques (INSEE). Given the data from the inventory of atmospheric pollutants in Aquitaine region done in 2010, urban and rural places of residence were respectively considered as high and low environmental exposures to particulate matter (AIRAQ 2010; Pradeau et al. 2015). Geocoding also made it possible to calculate the percentage of urbanized, industrial and road network zones within 1 km around residence.

2.5. Statistical analysis

The correlation between particle retention and gestational age was evaluated using a robust gamma rank correlation coefficient. This coefficient does not assume any specific distribution of data and is well suited for numerical data that may be subject to random perturbation or noise (Bodenhofer and Klawonn 2008).

Comparisons of particulate retention between groups according to maternal exposure or fetal and placental conditions were based on the Mann and Whitney test at a level of significance of α equal to 0.05. Statistical analyses were performed with R.2.15.3 software. The RoCoCo

package was used to estimate the robust gamma rank correlation coefficient (Bodenhofer and Krone 2013).

3. Results

3.1. Medical and exposure data

In total, 30 patients were included in this study. General information and maternal exposure data are summarized in Table 1. Patients were on average 26.4 years old (Standard deviation (SD): 7.2). Gestational age ranged from 22 to 37 weeks (mean 27.4 weeks; SD: 3.9 weeks) and fetal tissue weight was on average 1100.6 g (SD: 696.3 g). Eleven fetuses (36.7%) presented cardiac abnormalities (4 interventricular communications and 7 complex cardiopathies), and 15 presented abnormal placentas. Abnormalities were either an immature placenta (13) or a single umbilical artery (2).

No evident occupational exposure was identified in any of the 30 patients. A possible exposure was suspected in four patients whose occupations were as follows: architect (possibly exposed to mineral particles), vineyard worker (possibly exposed to carbonaceous and mineral particles), nurse (possibly exposed to carbonaceous particles) and cleaner (possibly exposed to metallic particles). The other patients were either unemployed (10) or held an unexposed job defined as an unexposed occupation in an unexposed industry (16).

Half of the patients were not significantly exposed to tobacco smoke. Patients exposed to tobacco smoke were second-hand smokers (3), ex-smokers (7) or active smokers (5). All ex-smokers had recently stopped smoking after diagnosis of their pregnancy. Finally, 63.3% of the patients (n=19) lived in a rural area and were thus considered as being at low risk of environmental exposure. Percentage of urbanized, industrial and road network zones within 1 km was under 15 % for all rural areas and over 40% for all urban areas.

3.2. Particles concentrations and chemical characterization in fetal lung samples by TEM-EDX

The concentration and chemical composition of the particles detected are summarized in Table 2. Micronic and nanosized particles were found in 23 (76.7%) fetal lung samples. In these samples, total numerical concentration ranged from 2.8 to 43.8 x 10⁶/g. Most of the particles detected were aggregates (73.4%) whose diameter ranged from 64 to 2533 nm (mean: 473 nm; SD: 453 nm). These aggregates were composed of particles whose size varied according to their chemical composition (mean size 50 nm for carbonaceous particles, 10 to

300 nm for metallic particles). No fibers were found. Other particles were isolated particles with a diameter between 54 and 489 nm (mean: 228 nm; SD: 115 nm).

Examples of micrographs and associated spectra of carbonaceous and metallic aggregates of nanosized particles and of an individual metallic nanosized particle are presented in Figure 1. Metallic particles appeared denser in TEM.

Metallic particles were found in 22 samples, representing 72.6 % of the particles found and accounting for 83.5% of the total developed surface. These particles were mainly composed of iron (34.3% of all particles), titanium (10.8%), iron-chromium-nickel alloy (stainless steel) (9.6%) and alumina (7.7%). Other metals were rarer, for example cerium particles that were found in two samples or tin and gadolinium particles found in one sample.

Approximately half of the aggregates (48.2%) were made of iron. Iron nanoparticle aggregates may have originated from an exogenous source but may also have come from endogenous iron (ferritin) (Powell et al. 2010). Such endogenous iron nanoparticles are particularly frequent in lungs in cases where congestion has been previously diagnosed. An example of each of these particles is shown in figure 2. As it is not always possible to differentiate these particles, statistical analyses were performed on total metallic particles and non-ferruginous metallic particles in order to select exogenous particles.

Carbonaceous particles were found in only 5 samples and accounted for 12.2 % of the particles found and 3.9% of the total surface area. Mineral particles were also found in 3 samples and were mainly composed of silicium.

3.3. Correlation between particle concentration in fetal lung tissues and maternal exposure

Robust gamma rank correlation coefficients are shown in Table 3. All coefficients tended toward 0, indicating that there was no correlation between total particle concentration expressed by numerical concentration and maternal age, gestational age or percentage of urbanization, industrial and road network zones within 1 km around the residence. Similar results were found for each chemical class of particles and for concentration expressed as surface area (data not shown).

Mean particle concentrations in samples from fetuses with cardiac abnormalities were not significantly different from the others. There were either no differences between the samples from fetus with placental abnormalities and those with normal placenta (data not shown).

No carbonaceous particles were found in fetal lung samples from non-smoker patients. There was therefore a significant excess of carbonaceous particles in the group with maternal

exposure to tobacco smoke (second-hand smoker, ex-smoker, current smoker). Although total concentrations and metallic particle concentrations tend to be slightly higher in the group exposed to tobacco smoke, the difference was not significant (table 4). The results were similar when retention was expressed as surface area (data not shown).

Concentration of all particles tends also to be higher in the high environmental exposure group but the difference was not significant for numerical concentration (table 5) nor for surface area (data not shown). This trend persisted when samples were stratified by maternal exposure to tobacco smoke but remained not significant (table 6). Results for metallic particles were similar when only exogenous metallic particles were considered after exclusion of ferruginous particles (data not shown).

4. Discussion

It has been suggested that early-life exposure to chemicals might predispose to cancer and other diseases later in life (Barton et al. 2005). Some prenatal effects of exposure to particles may be explained by dissolution and production of potentially toxic chemicals that could cross biological barriers (Wu et al. 2015). However, particle toxicity is also related to the insoluble part of particles, which may lead to higher levels of toxicity in localized areas (Schmid et al. 2009). The present study provides evidence that placental transfer of nanosized particles and fine particles is possible, resulting in fetal exposure to potentially harmful xenobiotics in particulate form.

Our results are consistent with the existing data on the placental transfer of particles. Experimental studies on murine models suggest that almost all types of nanoparticles tested are able to cross the placental barrier (Buerki-Thurnherr, von Mandach, and Wick 2012; Chu et al. 2010; Melnik et al. 2013), with possible adverse effects on the fetus such as inflammation (Tian et al. 2013), immune activation (El-Sayed et al. 2015), genotoxic effects (Balansky et al. 2013), low birth weight (Yamashita et al. 2011), defects in reproductive function (Jo et al. 2013; Kong et al. 2014; Takeda et al. 2009; Yoshida et al. 2010) and nerve system impairment (Cui et al. 2014; Ghaderi et al. 2015; Mohammadipour et al. 2014; Takeda et al. 2009; Umezawa et al. 2012), especially with repeated exposures (Di Bona et al. 2014). This transfer depends on particle size (Semmler-Behnke et al. 2014) although the threshold is not clear. Placental channels were described with a diameter of 15-25 nm allowing passive diffusion of smaller particles such as quantum dots (Chu et al. 2010) or gold nanoparticles (Semmler-Behnke et al. 2014). Yet particles over 500 nm have also been found to cross the placenta (Buerki-Thurnherr, von Mandach, and Wick 2012; Refuerzo et al. 2011). For these

bigger particles, clathrin-mediated or caveolae-mediated endocytosis may be the pathway of translocation through the maternal–fetal barrier (Rattanapinyopituk et al. 2014). Although this was not confirmed by our study, placental transfer is also thought to depend on gestational age (Juch et al. 2013; Yang et al. 2012). Indeed the placental barrier is thinner and probably more permeable to particles during the last three months of pregnancy (Pietroiusti, Campagnolo, and Fadeel 2013). In our study, half of the placentas were immature, consequently it is possible that we underestimated fetal retention.

To date there are very few data concerning placental transfer of particles in humans. Experimental ex-vivo perfusion studies suggested that 25-50 nm silica particles (Sonnegaard Poulsen et al. 2013) or fluorescent particles up to 240 nm (Wick et al. 2010) are able to cross the placental barrier with a possible bidirectional transfer (Grafmüller et al. 2015), although no transfer of gold particles was found (Myllynen et al. 2008). Data on particle retention in human fetal tissue are sparse. Haque et al. (Haque, Vrazel, and Uchida 1998) found asbestos fibers (mean length 1.55µm) in 50% of 82 lung, muscle and liver tissue specimens from stillborn infants. A significant association with fiber presence and maternal history of previous abortion and placental disease was also found. Our review of the literature did not reveal any other quantitative data for other particles in fetal tissues. In an observational study on 18 fetal samples similar to the present methodology, Gatti et al. found metal nanosized particles mostly in aggregated form (mean size between 3.9 and 7.5 µm) in liver and renal tissues. This presence was not correlated with maternal blood metal concentrations but was correlated with adverse fetal outcomes such as neural tube defects (Gatti et al. 2011) although the particles were not quantified.

To our knowledge, this is the first study to propose quantitative data on the retention of nanosized particles in fetal tissue, suggesting a correlation between maternal exposure to tobacco smoke and carbonaceous particles found in fetal lung samples. We also found a trend towards an excess of all types of particles in fetal lung samples from the highest environmental exposure group, which persisted when the samples were stratified by maternal exposure to tobacco smoke. These differences were not however statistically significant, probably because of low statistical power due to the small sample size included owing to patient inclusion difficulties in this type of study. The lack of difference may also be explained by the maternal exposure assessment which was focused on respiratory exposure. While this route is the most widely documented in literature and probably the main route of exposure (Schmid et al. 2009), it is also possible that we underestimated the other routes. For

example, dietary exposure is a potential source of exposure (Frohlich and Roblegg 2012; Powell et al. 2010) that needs to be taken into account in future investigations.

The choice of using lung tissue samples may also be criticized. According to a recent literature review, nanoparticles administered in experimental studies were more frequently found in tissues rich in cells from the mononuclear phagocyte system such as the liver, spleen and lymph nodes (Rinaldo et al. 2015). Recent data indicates that particles are retained in the same organs in the offspring (Tsyganova et al. 2014) but also in their lung (Lee et al. 2012; Qi et al. 2014). These data were still sparse at the time we set up this study. Since Haque et al (Haque, Vrazel, and Uchida 1998) had already found that fetal lung tissue was more frequently positive for asbestos fiber, and owing to the possible limitation in the sample preparation of blood-rich tissues such as the liver or spleen, we decided to analyze lung samples. Prior to our study, we conducted a preliminary phase of digestion, filtration and ultracentrifugation tests in order to determine the most relevant protocol. We decided to use filtration despite the possible bias due to the loss of individual particles. Our preliminary data indicated that particle loss was more proportional and reproducible using filtration rather than ultracentrifugation, especially for low density particles such as carbon particles.

Our data document fetal exposure to fine and ultrafine particles but we did not aim to assess whether fetal retention of exogenous particles was associated with adverse effects. Thus, although our results suggest that placental transfer of exogenous particles is possible in humans, it is still not clear whether this represents a significant toxicological risk.

5. Conclusions

This study demonstrates that exogenous particles are able to cross the placenta from maternal blood and accumulate in fetal tissue, where they can be characterized and quantified. The findings also suggest that it is possible to correlate the degree of retention in fetal lung tissues with maternal exposure data. Further studies are needed to determine whether this transfer presents a significant toxicological risk and to identify the factors that modify the rate of transfer. These studies are crucial to assess the risk for the fetus of both unintentional and commercial nanosized particles in view of their exponentially increasing utilization in various commercial products and especially in nanomedicine.

Acknowledgements

Pippa McKelvie-Sebileau for her careful reading of the manuscript and the English correction.

CONFLICT OF INTEREST

Funding Sources : NANOTRANS study is funded by Anses - French Agency for Food Environmental and Occupational Health & Safety (EST 09-85), the University Hospital of Bordeaux (CHU de Bordeaux) and the Regional Council of Aquitaine (convention 201013010007).

These funding sources were not involved in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; nor in the decision to submit the article for publication. The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- AIRAQ. 2015. *Report ET/PE/14/03 : Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en Aquitaine*. AIRAQ 2010 [cited 04.05.2015 2015]. Available from http://www.airaq.asso.fr/fileadmin/user_upload/redacteur/Inventaire_emissions_Aquitaine_2010_V2.0.pdf.
- Almeida, J. P., A. L. Chen, A. Foster, and R. Drezek. 2011. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 6 (5):815-835.
- Backes, C. H., T. Nelin, M. W. Gorr, and L. E. Wold. 2013. Early life exposure to air pollution: how bad is it? *Toxicol Lett* 216 (1):47-53.
- Bakand, S., A. Hayes, and F. Dechsakulthorn. 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 24 (2):125-135.
- Balansky, R., M. Longobardi, G. Ganchev, M. Ilcheva, N. Nedyalkov, P. Atanasov, R. Toshkova, S. De Flora, and A. Izzotti. 2013. Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice. *Mutat Res* 751-752:42-48.
- Barton, H. A., V. J. Cogliano, L. Flowers, L. Valcovic, R. W. Setzer, and T. J. Woodruff. 2005. Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. *Environ Health Perspect* 113 (9):1125-1133.
- Blum, J. L., J. Q. Xiong, C. Hoffman, and J. T. Zelikoff. 2012. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci* 126 (2):478-486.
- Bodenhofer, U., and F. Klawonn. 2008. Robust rank correlation coefficients on the basis of fuzzy orderings: Initial steps. *Mathware & Soft Computing* 15:5-20.
- Bodenhofer, U., and M. Krone. 2015. *RoCoCo: An R package implementing a robust rank correlation coefficient and a corresponding test*. Institute of Bioinformatics, Johannes Kepler University 2013 [cited 2015]. Available from <http://cran.r-project.org/web/packages/rococo/vignettes/rococo.pdf>.

- Buerki-Thurnherr, T., U. von Mandach, and P. Wick. 2012. Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med Wkly* 142:w13559.
- Campagnolo, L., M. Massimiani, G. Palmieri, R. Bernardini, C. Sacchetti, A. Bergamaschi, L. Vecchione, A. Magrini, M. Bottini, and A. Pietroiusti. 2013. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol* 10:21.
- Chu, M., Q. Wu, H. Yang, R. Yuan, S. Hou, Y. Yang, Y. Zou, S. Xu, K. Xu, A. Ji, and L. Sheng. 2010. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small* 6 (5):670-678.
- Cui, Y., X. Chen, Z. Zhou, Y. Lei, M. Ma, R. Cao, T. Sun, J. Xu, M. Huo, R. Cao, C. Wen, and Y. Che. 2014. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere* 96:99-104.
- Di Bona, K. R., Y. Xu, P. A. Ramirez, J. DeLaine, C. Parker, Y. Bao, and J. F. Rasco. 2014. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 50:36-42.
- El-Sayed, Y. S., R. Shimizu, A. Onoda, K. Takeda, and M. Umezawa. 2015. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology* 327:53-61.
- Ema, M., N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, and J. Nakanishi. 2010. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol* 30 (3):343-352.
- Ema, M., M. Naya, M. Horimoto, and H. Kato. 2013. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* 42:1-17.
- Frohlich, E., and E. Roblegg. 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291 (1-3):10-17.
- Gatti, A. M., P. Bosco, F. Rivasi, S. Bianca, G. Ettore, L. Gaetti, S. Montanari, G. Bartoloni, and D. Gazzolo. 2011. Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:221-226.
- Ghaderi, S., S. R. Tabatabaei, H. N. Varzi, and M. Rashno. 2015. Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice. *J Toxicol Sci* 40 (2):263-275.
- Grafmueller, S., P. Manser, L. Diener, P. A. Diener, X. Maeder-Althaus, L. Maurizi, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach, and P. Wick. 2015. Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an Human Placental Perfusion Model. *Environ Health Perspect*.
- Grafmuller, S., P. Manser, H. F. Krug, P. Wick, and U. von Mandach. 2013. Determination of the transport rate of xenobiotics and nanomaterials across the placenta using the ex vivo human placental perfusion model. *J Vis Exp* (76).
- Haque, A. K., D. M. Vrazel, and T. Uchida. 1998. Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas. *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (3):532-538.
- Hong, J. S., M. K. Park, M. S. Kim, J. H. Lim, G. J. Park, E. H. Maeng, J. H. Shin, M. K. Kim, J. Jeong, J. A. Park, J. C. Kim, and H. C. Shin. 2014. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2:159-171.
- Hougaard, K., B. Fadeel, M. Gulumian, V. Kagan, and K. Savolainen. 2011. Developmental toxicity of engineered nanoparticles. In *Reproductive and developmental toxicology*, edited by R. Gupta. Amsterdam: Academic Press, 269-290.

- Hougaard, K. S., L. Campagnolo, P. Chavatte-Palmer, A. Tarrade, D. Rousseau-Ralliard, S. Valentino, M. V. Park, W. H. de Jong, G. Wolterink, A. H. Piersma, B. L. Ross, G. R. Hutchison, J. S. Hansen, U. Vogel, P. Jackson, R. Slama, A. Pietroiusti, and F. R. Cassee. 2015. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol* 56:118-140.
- Jackson, P., K. S. Hougaard, A. M. Boisen, N. R. Jacobsen, K. A. Jensen, P. Moller, G. Brunborg, K. B. Gutzkow, O. Andersen, S. Loft, U. Vogel, and H. Wallin. 2012. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology* 6 (5):486-500.
- Jackson, P., U. Vogel, H. Wallin, and K. S. Hougaard. 2011. Prenatal exposure to carbon black (printex 90): effects on sexual development and neurofunction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109 (6):434-437.
- Jo, E., G. Seo, J. T. Kwon, M. Lee, B. Lee, I. Eom, P. Kim, and K. Choi. 2013. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. *J Toxicol Sci* 38 (4):525-530.
- Juch, H., L. Nikitina, P. Debbage, G. Dohr, and M. Gauster. 2013. Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues. *Reprod Toxicol* 41:73-79.
- Kannan, S., D. P. Misra, J. T. Dvornik, and A. Krishnakumar. 2006. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ Health Perspect* 114 (11):1636-1642.
- Kong, L., M. Tang, T. Zhang, D. Wang, K. Hu, W. Lu, C. Wei, G. Liang, and Y. Pu. 2014. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *Int J Mol Sci* 15 (11):21253-21269.
- Kulvietis, V., V. Zalgevičienė, J. Didziapetrienė, and R. Rotomskis. 2011. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med* 225 (4):225-234.
- Landsiedel, R., E. Fabian, L. Ma-Hock, B. van Ravenzwaay, W. Wohlleben, K. Wiench, and F. Oesch. 2012. Toxicokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol* 86 (7):1021-1060.
- Lee, Y., J. Choi, P. Kim, K. Choi, S. Kim, W. Shon, and K. Park. 2012. A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. *Toxicol Res* 28 (3):139-141.
- Li, C., X. Li, A. K. Suzuki, Y. Zhang, Y. Fujitani, K. Nagaoka, G. Watanabe, and K. Taya. 2013. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev* 59 (2):145-150.
- Mathiesen, L., T. A. Morck, G. Zuri, M. H. Andersen, C. Pehrson, M. Frederiksen, T. Mose, E. Rytting, M. S. Poulsen, J. K. Nielsen, and L. E. Knudsen. 2014. Modelling of human transplacental transport as performed in Copenhagen, Denmark. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 115 (1):93-100.
- Melnik, E. A., Y. P. Buzulukov, V. F. Demin, V. A. Demin, I. V. Gmoshinski, N. V. Tyshko, and V. A. Tutelyan. 2013. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* 5 (3):107-115.
- Menezes, V., A. Malek, and J. A. Keelan. 2011. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Curr Pharm Biotechnol* 12 (5):731-742.
- Mohammadipour, A., A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, M. Hosseini, and A. E. Bideskan. 2014. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* 37 (2):617-625.

- Myllynen, P. K., M. J. Loughran, C. V. Howard, R. Sormunen, A. A. Walsh, and K. H. Vahakangas. 2008. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* 26 (2):130-137.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, and C. Cox. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16 (6-7):437-445.
- Pietrojusti, A., L. Campagnolo, and B. Fadeel. 2013. Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. *Small* 9 (9-10):1557-1572.
- Powell, J. J., N. Faria, E. Thomas-McKay, and L. C. Pele. 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun* 34 (3):J226-233.
- Pradeau, C., V. Rondeau, E. Leveque, P. Y. Guernion, E. Tentillier, M. Thicoipe, and P. Brochard. 2015. Air pollution and activation of mobile medical team for out-of-hospital cardiac arrest. *Am J Emerg Med* 33 (3):367-372.
- Qi, W., J. Bi, X. Zhang, J. Wang, J. Wang, P. Liu, Z. Li, and W. Wu. 2014. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep* 4:4352.
- Rattanapinyopituk, K., A. Shimada, T. Morita, M. Sakurai, A. Asano, T. Hasegawa, K. Inoue, and H. Takano. 2014. Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles. *J Vet Med Sci* 76 (3):377-387.
- Refuerzo, J. S., B. Godin, K. Bishop, S. Srinivasan, S. K. Shah, S. Amra, S. M. Ramin, and M. Ferrari. 2011. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. *Am J Obstet Gynecol* 204 (6):546.e545-549.
- Rinaldo, M., P. Andujar, A. Lacourt, L. Martinon, M. Canal Raffin, P. Dumortier, J. C. Pairon, and P. Brochard. 2015. Perspectives in Biological Monitoring of Inhaled Nanosized Particles. *Ann Occup Hyg*.
- Saunders, M. 2009. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1 (6):671-684.
- Schmid, O., W. Moller, M. Semmler-Behnke, G. A. Ferron, E. Karg, J. Lipka, H. Schulz, W. G. Kreyling, and T. Stoeger. 2009. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* 14 Suppl 1:67-73.
- Semmler-Behnke, M., J. Lipka, A. Wenk, S. Hirn, M. Schaffler, F. Tian, G. Schmid, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2014. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol* 11 (1):33.
- Sonnegaard Poulsen, M., T. Mose, L. Leth Maroun, L. Mathiesen, L. Ehlert Knudsen, and E. Rytting. 2013. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. *Nanotoxicology*.
- Stieb, D. M., L. Chen, M. Eshoul, and S. Judek. 2012. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res* 117:100-111.
- Takahashi, Y., K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio, and K. Takeda. 2010. Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. *J Toxicol Sci* 35 (5):749-756.
- Takeda, K., K.-i. Suzuki, A. Ishihara, M. Kubo-Irie, R. Fujimoto, M. Tabata, S. Oshio, Y. Nihei, T. Ihara, and M. Sugamata. 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *J. Health Sci* 55 (1):95-102.
- Tian, X., M. Zhu, L. Du, J. Wang, Z. Fan, J. Liu, Y. Zhao, and G. Nie. 2013. Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy. *Small* 9 (14):2432-2439.

- Tsyganova, N. A., R. M. Khairullin, G. S. Terentyuk, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, S. N. Erykov, and N. G. Khlebtsov. 2014. Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier. *Bull Exp Biol Med* 157 (3):383-385.
- Umezawa, M., H. Tainaka, N. Kawashima, M. Shimizu, and K. Takeda. 2012. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J Toxicol Sci* 37 (6):1247-1252.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, and U. von Mandach. 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118 (3):432-436.
- Wu, J., C. Yu, Y. Tan, Z. Hou, M. Li, F. Shao, and X. Lu. 2015. Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats. *Environ Res* 138c:67-73.
- Yamashita, K., Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T. Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, and Y. Tsutsumi. 2011. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 6 (5):321-328.
- Yang, H., C. Sun, Z. Fan, X. Tian, L. Yan, L. Du, Y. Liu, C. Chen, X. J. Liang, G. J. Anderson, J. A. Keelan, Y. Zhao, and G. Nie. 2012. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep* 2:847.
- Yoshida, S., K. Hiyoshi, S. Oshio, H. Takano, K. Takeda, and T. Ichinose. 2010. Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring. *Fertil Steril* 93 (5):1695-1699.

Table 1: Clinical characterization and maternal exposure data.

Medical and maternal exposure data		
General data	Mean	SD*
Maternal age (years)	26.4	7.2
Gestational age (weeks)	27.4	3.9
Fetal weight (g)	1100.6	696.3
Maternal exposure	N*	%
Occupational exposure		
Unexposed job	16	53.3
Possible	4	13.3
Unemployed	10	33.3
Environmental exposure		
Low	11	36.7
High	19	63.3
Exposure to tobacco smoke		
None	15	50.0
Second-hand smoker	3	10.0
Ex-smoker	7	23.3
Current smoker	5	16.7

*SD: Standard Deviation, N: number of cases

Table 2: Chemical composition of particles detected in fetal lung samples

	Concentration (10 ⁶ part./g)					Surface (mm ² /g)			
	N*	Mean	SD**	Min	Max	Mean	SD	Min	Max
Total	23	12.7	11.6	2.8	43.8	1.29	1.94	0.01	6.68
Carbonaceous	5	7.2	5.7	3.2	16.8	0.23	0.29	0.03	0.71
Mineral									
All	3	14.9	8.7	8.4	24.7	1.24	1.78	0.12	3.29
Si	3	12.3	11.0	3.8	24.7	1.14	1.86	0.02	3.29
Metallic									
All	22	9.7	8.0	2.8	35.6	1.12	1.83	0.01	6.60
Fe	12	8.4	6.6	3.8	27.3	1.70	2.39	0.02	6.60
Ti	6	5.3	2.3	3.3	9.7	0.30	0.48	0.05	1.28
Fe Cr Ni	6	4.7	1.9	2.8	8.2	0.40	0.37	0.05	1.05
Al	3	7.5	6.0	3.8	14.4	0.58	0.85	0.02	1.55
Other	7	4.1	0.5	3.2	4.6	0.14	0.16	0.01	0.46

*N: number of samples with particles of each category, **SD: Standard Deviation,

Table 3: Robust gamma rank correlation coefficients between numerical concentrations of particles in fetal lung tissues and quantitative variables.

	Total particles	Carbon particles	Metallic particles
Maternal age (years)	-0.04	0.03	-0.06
Gestational age (weeks)	-0.05	0.11	-0.13
% of urbanization, industrial and road network zones	0.07	-0.06	0.1

Table 4: Comparison of mean number of particles in fetal lung tissues according to maternal exposure to tobacco smoke

	Mean concentration $\times 10^6/g$ (SD)		P-value
	Tobacco smoke		
	Not exposed	Exposed**	
Total particles	8.72 (11.36)	10.82 (11.92)	0.602
Carbon particles	0.00 (0.00)	2.39 (4.65)	0.018*
Metallic particles	6.31 (8.79)	7.87 (7.54)	0.66

*Significant results (P<0.05).

**Second-hand smoker, ex-smoker, current smoker.

SD: standard deviation

Table 5: Comparison of mean number of particles in fetal lung tissues according to maternal environmental exposure.

	Mean number of particles $\times 10^6/g$ (SD)		P-value
	Low	High	
	environmental exposure	environmental exposure	
Total particles	5.01 (3.98)	12.52 (13.49)	0.225
Carbon particles	0.64 (1.42)	1.51 (4.21)	1
Metallic particles	4.38 (4.14)	8.66 (9.42)	0.339

SD: standard deviation

Table 6: Comparison of mean number* of particles in fetal lung tissue according to tobacco smoke and environmental exposure (SD)

	Not exposed to tobacco smoke			Exposed to tobacco smoke**		
	Low environmental exposure	High environmental exposure	P-value	Low environmental exposure	High environmental exposure	P-value
Total particles	4.15 (3.90)	11.00 (13.27)	0.493	5.73 (4.26)	14.21 (14.32)	0.288
Carbon particles	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	-	1.17 (1.82)	3.20 (5.82)	0.726
Metallic particles	4.15 (3.90)	7.39 (10.46)	0.755	4.57 (4.70)	10.08 (8.49)	0.261

*Mean number $\times 10^6/g$

**Second-hand smoker, ex-smoker, current smoker

SD: standard deviation

Figure legends

Figure 1: (A) Micrograph of a carbonaceous aggregate (x30000) and associated spectrum; (B) micrograph of an alloy Fe, Cr, Ni (stainless steel) isolated particle (x60000) and associated spectrum; (C) micrograph of a cerium aggregate (x80000) and associated spectrum.

Figure 2: Micrograph of exogenous (A) and endogenous (B) iron nanoparticle aggregates and associated energy dispersive X-ray spectra.

Rinaldo Mickael

De: res@karger.com
Envoyé: dimanche 16 août 2015 11:27
À: Rinaldo Mickael
Objet: 'Respiration': 201508024

'Respiration'
Ms. No.: 201508024

Dear Dr. Rinaldo,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Pleural retention of fine and nanosized inhaled particles and accumulation in black spots: A pilot study' to Respiration.

It will now be forwarded to the Editors and we shall inform you as soon as possible of their decision.

The manuscript reference number is 201508024. Please use this number on all correspondence about the manuscript, which should be sent to the Respiration editorial office at the address listed below.

For information regarding the status of your manuscript and for future submissions to Respiration, you can access this system by logging into the journal's online peer review system as follows:

<http://oper1.karger.com/xpresstrack/submissions/index.cfm?jid=102>

Logon Name: mickael.rinaldo@chuv.ch

Password: merdocu

With kind regards,

Linda Haas
Editorial Office 'Respiration'
t +27 79 341 4419
res@karger.com

S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Allschwilerstrasse 10, 4009 Basel, Switzerland t +41 61 306 1111, f +41 61 306 1234, www.karger.com

Pleural retention of fine and nanosized inhaled particles and accumulation in black spots: A pilot study

Mickael Rinaldo¹⁻³, Aude Lacourt^{1,2}, Pascal Andujar⁴⁻⁶, Laurent Martinon⁷, Xavier Janson⁷, Jean-Claude Pairon^{4-6,7}, Mireille Canal Raffin^{1,2,8}, Elisabeth Sellier⁹, Pascal Dumortier¹⁰, Patrick Brochard^{1,2,7,8}

¹Université de Bordeaux, Bordeaux, France; ²INSERM, U897, Bordeaux, France; ³Institut universitaire romand de Santé au travail, Epalinges, Suisse, ⁴INSERM, U955, Créteil, France; ⁵Université Paris-Est, Créteil, France; ⁶Centre Hospitalier Intercommunal Créteil, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, France; ⁷Laboratoire d'étude des particules inhalées de la Ville de Paris, Paris, France; ⁸CHU de Bordeaux, Bordeaux, France ⁹Cremem-Placamat UMS 3626 87, Pessac, France; ¹⁰Hôpital Erasme, Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

SHORT TITLE: Inhaled nanosized particles in the pleura

CORRESPONDING AUTHOR

Dr Mickael RINALDO, Institut universitaire romand de Santé au Travail. Route de la corniche 2 CH-1066 Epalinges-Lausanne

E-mail: mickael.rinaldo@chuv.ch

Tel: 00 41 21 314 74 21 Fax: 00 41 21 314 74 30

NUMBER OF WORDS: 3780

Key words: Nanosized particles; Ultrafine particles; Retention, Translocation; Pleura; Lung; Black spot; Electron microscopy

Abstract

Background: Coal dust or asbestos fibers can concentrate in macroscopic structures of the parietal pleura known as black spots.

Objective: To characterize, quantify and compare particles found into lung parenchyma, normal and anthracotic pleura (black spots), especially nanosized particles.

Methods: We used transmission electron microscopy to analyze normal pleura, black spots and lung parenchyma samples from 10 patients selected from a previously published study. The samples were digested in bleach and particles retained by microfiltration were quantified by image analysis, and identified by energy dispersive X-ray analysis.

Results: Particle concentration ranges in the black spots ($16.2 \pm 26 \times 10^9$ particles/g of dry weight) were similar to in the lung parenchyma ($9.2 \pm 7.8 \times 10^9$ p/g), and significantly higher than in normal pleura ($1.1 \pm 0.6 \times 10^9$ p/g). The mean diameter of particles was higher in the lung compared to the black spots and the normal pleura. Particle composition was similar in the lung and black spots: more than half of the particles were aggregates of nanosized particles mainly composed of carbon. The percentage of mineral particles was higher in the black spots ($38.6 \pm 13.9\%$) than in the lung ($27.5 \pm 12.5\%$) and exogenous nanosized particles of iron, stainless steel and titanium were found in both samples.

Conclusion: This study demonstrates that the parietal pleura is able to retain inhaled fine and nanosized particles that concentrate in black spots. Further investigations are required to understand the kinetics of the translocation of these particles to the pleura and the consequences of their concentration in black spots.

Abbreviations

EDX: Energy dispersive X-ray analysis

S.D.: Standard deviation

TEM: Transmission electron microscopy

1. Introduction

The toxicity of ultrafine fractions of particulate matter (atmospheric pollution) has been highlighted by epidemiological studies observing an increase of the incidence of pulmonary diseases (pneumonia, asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer) or cardiovascular morbidity and mortality (Kendall and Holgate 2012; Ostiguy et al. 2006a; Yang, Peters, and Williams 2008). This correlates with experimental studies demonstrating respiratory (Andujar et al. 2011; Bonner 2010) and extra-pulmonary effects on the cardiovascular, neurological and immune systems (Ostiguy et al. 2006a) after exposure to nanosized particles. Metallic nanoparticles have been reported to induce cytotoxic effects in mesothelial cells in *in vitro* studies (Brunner et al. 2006; Glista-Baker et al. 2012) and inhalation of micronic indium phosphide particles may induce pleural fibrosis in rats (Kirby et al. 2009). Carbon nanotubes may induce genotoxicity *in vitro* or inflammation, epithelial changes and even carcinogenicity after *in vivo* respiratory exposure (Murphy et al. 2012; Sargent et al. 2014). Thus, pleura is a possible target both for migration and carcinogenicity of these particles, raising concerns for human occupational exposure (Dikensoy and Bayram 2010; Donaldson et al. 2010; Sargent et al. 2014). The parietal pleura is known to concentrate coal and black dust in coal miners' lungs (Boutin et al. 1996). For fibrous particles such as asbestos fiber (Sebastien et al. 1980) or carbon nanotubes (Murphy et al. 2011), retention has been observed to be length-dependent. Particles accumulate in parietal pleura and form anthracotic areas known as black spots (Boutin et al. 1996; Donaldson et al. 2010), which are more frequently located in the paravertebral and axillary lower costal zones, or in the diaphragmatic zones (Mitchev, Dumortier, and De Vuyst 2002). Very little is known about the possible translocation into human pleura of other particles, especially nanosized particles, nor about their possible concentration in black spots.

This study uses transmission electron microscopy (TEM) to characterize, quantify and compare the particles found into lung parenchyma, normal pleura and black spots from a series of 10 patients selected from a previous study (Mitchev, Dumortier, and De Vuyst 2002).

2. Material and methods

2.1. The population

The study was performed in the University Hospital in Bordeaux during November 2013 and September 2014. Ten patients were selected from a previously published study in which the distribution, macroscopic appearance of blacks spot and possible relationship with pleural

plaques were studied in 150 consecutive necropsies of urban dwellers performed during May 1999 and July 2001 in the Pathology Department of Erasme Hospital, Brussels, Belgium (Mitchev, Dumortier, and De Vuyst 2002). In this study, the parietal pleura (costal, diaphragmatic, and mediastinal) was examined for the presence of black spots and pleural plaques. Thereafter, lung parenchyma and parietal pleura samples were collected and kept in a filtered 10% formalin solution.

To ensure samples with significant particle retention in the lungs, we selected only male patients with a significant asbestos body lung concentration in whom adequate lung, normal pleura and black spots samples were available.

In accordance with French law, the study protocol was approved by the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer III).

2.2. Sample preparation

All reactive agents were filtered with a 0.2- μm filter and all equipment was rinsed with ultrapure water before utilization. For each patient, a lung sample, an anthracotic and a normal parietal pleura sample were selected as follows. The lung samples were selected avoiding the visceral pleura. The pleura samples were spread on a Petri dish and examined to select an anthracotic area and a normal area at least 1 cm apart, also avoiding pleural plaques. The samples were rinsed with ultrapure water in order to remove formalin and then divided into two samples: the first sample (weighing approximately 200 mg for the lung sample and 100 mg for the pleura samples) was prepared by a digestion/filtration procedure and the second sample was weighed before and after desiccation for 24h in order to calculate the wet weight/dry weight ratio.

The first sample was placed in a 25 ml Erlenmeyer flask with 10 ml of concentrated sodium hypochlorite previously heated to 40 °C and agitated by an orbital agitator for 1h. After agitation, 5 ml of filtered isopropanol was added. After manual agitation, this suspension was filtered by suction in a Pyrex microanalysis device (Millipore[®]) using a pre-carbonated 37 mm polycarbonate filter with a pore size of 0.2 μm (Whatman[®]). After filtration and drying, the filter was carbon-coated with a carbon evaporator. The particles trapped between the two layers of carbon were then transferred to a TEM copper-indexed 200-mesh grid. A piece of filter was deposited on two grids placed on Whatman[®] filter paper soaked with 2 ml chloroform in a closed Petri dish until total evaporation to dissolve the polycarbonate filter.

Samples were prepared in series of 3 or 6 samples. For each series a blank was performed under the same conditions and with the same reagent and then analyzed with the same TEM protocol.

2.3. Transmission electron microscopy analysis

Two TEM analyses were performed: a quantitative analysis and a chemical analysis.

2.3.1. Quantitative analysis

The grids were analyzed under TEM (TECNAI 12, FEI). The grid was first examined at low magnification between x80 and x1000 to check quality and uniformity, then a grid opening was examined at x30,000. Twenty-five microphotographs were taken on each grid (50 microphotographs for each sample) using the same framework of preregistered coordinates to avoid a selection bias.

The images were analyzed with Image J 1.43u software (NIH, USA). Briefly, each particle was contoured with a Bamboo Pen tablet (WACOM) to calculate its surface and diameter (ferret diameter). Each particle was classified according to its morphology (individual particles, aggregates, fibers). Global concentration and concentration per morphologic class were calculated and expressed either as a numerical concentration or as developed area per unit of dry weight (n/g or mm²/g).

2.3.2. Chemical analysis

The grids were analyzed under a transmission electron microscope (JEOL 2010 LaB6) equipped with an energy-dispersive X-Ray analysis (EDX) system (IDFix 12.2.1, SAM'X).

This EDX microanalysis system collects the X-rays generated by the interaction between the surface of the sample and the electron beam, then sorts and plots them by energy to produce a spectrum in which elements with an atomic number greater than boron are detected. EDX analyses were conducted at an accelerating voltage of 200 kv, 7° tilt angle using collection times of 60-200 s.

A grid opening was examined at a magnification from x30,000 to x100,000. Three classes of particles were defined: individual particles $\geq 1 \mu\text{m}$, individual particles $\leq 1 \mu\text{m}$, and aggregates of nanosized particles. When particles were abundant, at least 20 particles of each class were randomly analyzed. In the event of a low burden, the analyses were performed on all the particles of the class found on 5 grid openings. Each particle found was measured and analyzed by EDX to deduce its elemental composition. As carbonaceous aggregates are easily

identified according to their aspect, they were not systematically analyzed and EDX analyses were focused on other aggregates.

The morphology and the elemental composition made it possible to classify the particles by chemical composition as mineral particles (silica, silicate and calcium compounds), metallic particles (particles mainly composed of metals and metal oxides) or carbonaceous particles. The results were expressed as a percentage of each class in each sample and as a percentage of an elemental composition in each class.

2.4. Statistical analysis

The correlation between concentrations in particles of the tissues was evaluated using a robust gamma rank correlation coefficient. This coefficient does not assume any specific distribution of data and is well suited for numerical data that may be subject to random perturbation or noise (Bodenhofer and Klawonn 2008).

The RoCoCo package was used to estimate the robust gamma rank correlation coefficients (Bodenhofer and Krone 2013). Comparisons of particulate retention between the different tissues were based on the Friedman test at $\alpha=0.05$ level of significance. Comparisons of the composition of particles found with the EDX analysis (e.g. percentage of silica particles in the lung or black spots) were based on the Wilcoxon test at $\alpha=0.05$ level of significance. Statistical analyses were performed with R.2.15.3 software.

The results will be expressed as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Patients

Mean patient age was 74.1 \pm 9.5 years (Table 1). Lung concentrations of asbestos bodies were comprised between 1 and 138.4 $\times 10^3$ /g of dry tissue (Mean: 22.1; SD: 44). Four patients were smokers, two ex-smokers, one non-smoker and smoking status was unknown in 3 patients. Mean dry weight of the sample was 20.1 \pm 6.1 mg for lung samples, 18.5 \pm 11.1 for normal pleura samples and 14.8 \pm 6.1 mg for black spots samples.

3.2. Particle concentrations

An example of micrographs of particles from the lung, black spots and normal pleura is given in Figure 1 for a patient (patient 3) in whom the weight of tissues per surface unit of filter were roughly similar (respective dry weight analyzed: 15.3, 15.1 and 18.5 mg). The particle

burden seemed similar in the lung and in black spots, in contrast with the lower burden in normal pleura.

The particle concentrations observed in the different samples are shown in Figure 2 and summarized in Table 2. Extreme values in lung samples ranged from 0.04 to 21.6×10^9 particles/g of dry tissues, with a mean of $9.2 \pm 7.8 \times 10^9$ p/g. Concentrations in the black spots ranged from 4.1 to 89.5 to $\times 10^9$ particles/g of dry tissue with a mean of $16.2 \pm 26 \times 10^9$ p/g. There were no significant differences between mean concentrations in the lung and the anthracotic pleura (Table 3). On the other hand, concentrations were significantly lower in normal pleura, ranging from 0.3 to 2.4×10^9 p/g with a mean of $1.1 \pm 0.6 \times 10^9$ p/g. In both the lung and the black spots, the particles were mainly aggregates (respectively 65.3% and 54.1%). Principally, these aggregates had a carbonaceous aspect in both tissues. Carbonaceous aggregates represented 51.6 % of particles in the lung and 42.5 % of particles in the black spots and 79% and 78.5% of all aggregates in the lung or black spots respectively. The other particles were individual particles (32.5% in the lung, 42.8% in the black spots) and fibers (2.2%, 3%). In the normal pleura, 82.2% of particles were individual particles, the others being carbonaceous aggregates. No fibers were found in normal pleura.

The mean diameter of particles was similar with no significant differences between the lung and the black spots. Mean diameter was significantly lower in the normal pleura compared with the other samples (Lung: 623 ± 129.1 nm, black spots: 533 ± 103 nm, normal pleura: 296 ± 153 nm). These findings were similar for individual particles and aggregates (data not shown). Individual nanosized particles represented 6.8%, 7.3% and 24% of individual particles in lung, black spots and normal pleura with mean diameter of 74 ± 5 , 68 ± 13 , 82 ± 13 nm, respectively.

3.3. Composition of particles

The chemical composition of particles in the lung and the black spots were similar as shown in Figure 3. There were no significant differences between lung and black spots samples. About half of the particles were carbonaceous particles (Lung: $56.6 \pm 18.1\%$, Black spot: $47.4 \pm 18.4\%$). Mineral particles represented more than a quarter of the particles in the lung and more than a third in black spots ($27.5 \pm 12.5\%$ vs. $38.6 \pm 13.9\%$). Metallic particles represented 14% of particles ($14 \pm 7.5\%$ vs. $13.9 \pm 10.9\%$).

The composition of mineral and metallic particles is shown in Figure 4. Approximately 70% of mineral particles were silicate particles. The other mineral particles were particles of pure

silica (lung: 23.2%; black spots: 31.6%) and calcium compounds (lung: 1%; black spots: 5.7%).

More than one third of metallic particles were made of titanium (lung: 36.6%; black spots: 37.3%). This proportion was higher for aggregates, reaching approximately half (lung: 49.1%; black spots: 47.3%). Examples of carbon and titanium particles are shown in Figure 5.

Aluminum particles were more frequent in black spots than in lung tissues (lung: 7.7%; black spots: 17.2%) and iron particles were more frequent in the lung than in black spots (lung: 28.5%; black spots: 10%). Other metallic particles were found such as chromium, tin, ceria particles or alloys of these compounds with iron, alumina, titanium or magnesium.

There were no clear correlations between particle concentrations in the different types of samples (data not shown).

4. Discussion

Although translocation of asbestos fibers to the pleura has previously received attention (Boutin et al. 1996; Dodson and Atkinson 2006; Sebastien et al. 1980), to our knowledge, this is the first study in which nano- and micro-sized non-fibrous particles were characterized and quantified in human lung parenchyma and pleura. We demonstrate that fine and nanosized particles may be retained in the parietal pleura, concentrating in specific areas forming black spots in which the concentrations may exceed those in the parenchyma.

Our results on the lung retention are consistent with those published by Brauer *et al.* on autopsy lungs from never-smoking residents of Mexico City (Brauer et al. 2001). In this study based on a similar method, mean total particle concentration in the lung samples ($2.05 \pm 3.9 \times 10^9$ p/g) was lower but in same range as in our study ($9.2 \pm 7.8 \times 10^9$ p/g). This difference and the lower proportion of carbon aggregate in their study (25% in the samples from Mexico City, 51.6% in our samples) may be explained by the differences in tobacco status. This lung retention results from the mechanisms of deposition and clearance. After inhalation, which is the major route, pulmonary absorption of the particles is size-dependent with deposition of micronic particles in the tracheobronchial region by impaction or sedimentation and deposition of nanosized particles by diffusion or electrostatic precipitation in the nasopharyngeal, tracheobronchial and alveolar regions (Geiser and Kreyling 2010). After deposition, the particles can be cleared by chemical dissolution or physical translocation (Oberdorster et al. 2004). In the tracheobronchial airways, particles are transported by mucociliary clearance towards the larynx and swallowed into the gastrointestinal tract (Geiser and Kreyling 2010). Due to penetration through the periciliary space and possible deposition

in areas without mucus, nanosized particles may undergo long-term tracheobronchial retention (Kreyling et al. 2013). In the alveolar region, the major mechanism is phagocytic uptake by alveolar macrophages followed by dissolution or transport and accumulation in the lymphatic system. The half-life of micronic particles in human alveolar region is 700 days (Oberdorster, Oberdorster, and Oberdorster 2005) and is probably much longer for nanosized particles (Oberdorster et al. 2004; Schmid et al. 2009).

Particles that are not cleared may undergo a systemic translocation through the conductive airway epithelium, nerve cells or the alveolocapillary barrier, which is the major route given its large surface area and intimate air-blood contact (Landsiedel et al. 2012). The first step is transport across the epithelium via a paracellular route following the physiologic transport of water, a transcellular route via pinocytosis, or transported by phagocytes (Miserocchi et al. 2008). After interstitial translocation, they can either pass through the endothelial cells to the systemic circulation and peripheral organs (Holt 1981; Oberdorster et al. 2004), return to the alveoli or airway space after uptake by phagocytes, or be drained by lymphatic circulation (Geiser and Kreyling 2010; Leak 1980) and retained in lymphatics nodes (Miserocchi et al. 2008). A regional translocation is also possible from the alveolar space to the pleural space, followed by lymphatic drainage in the parietal pleura during inspiration. Particles in the parietal pleura may thus come from systemic circulation through vascularization by the intercostal and diaphragmatic arteries or from pleural liquid (Bernaudin and Fleury-Feith 2006).

Our findings are also consistent with previous data on asbestos particles in which concentrations were sometimes higher in the pleura than in the lung (Dumortier et al. 2002). The black spots in the samples that we analyzed were mainly composed of aggregates of nanosized combustion-derived particles. This finding is in contrast with the initial hypothesis and findings of Muller *et al* who found alumino-silicate to be preponderant in black spots, and described lesions in coal miners as anthraco-silicosis (Muller, Schmitz, and Konstantinidis 2002). On the other hand, it is consistent with Donaldson *et al* who hypothesized that a proportion of all deposited particles including urban particulate matter reach the parietal pleura, may interstitialize around the stomata to form black spots (Donaldson et al. 2010) and may induce pleural inflammation or diseases (Donaldson et al. 2013). This transfer and the retention around the stomata have been found to be size-dependent (length dependent on carbon nanotubes) (Murphy et al. 2011). This size-dependent transfer might explain why the composition of aluminum particles differed between the lung and black spots in our study, although the difference was not statistically significant. The different composition may also

be due to endogenic particles. Indeed, endogenic iron may be produced by congestive or inflammatory mechanisms, especially in the lung parenchyma.

We did not find any correlation between parenchymal and black spot concentrations. Several hypotheses might explain these findings. First, little is known about the kinetics of pleural translocation of particles. In experimental studies mainly in rodents, translocation of inhaled amosite fibers to parietal pleura occurs quite rapidly within a week after exposure (Bernstein et al. 2011; Broaddus et al. 2011; Fleury Feith and Jaurand 2013). It is even more rapid for multiwall carbon nanotubes which reach the pleural space one day after exposure with an equilibrium between translocation from the alveolar space and lymphatic clearance 26 days after (Mercer et al. 2010). These particles were still found in pleural liquid 336 days after inhalation exposure (Mercer et al. 2013). Caution is required when extrapolating these data to humans, given the anatomical and microscopic differences in humans, especially between rodent and human visceral pleura (Broaddus et al. 2011) and the differences in deposition patterns found for soot and coal dust particles in the lungs of rodents and primates (Nikula et al. 1997). Nevertheless, these mechanisms may likely require more time to achieve an equilibrium, probably decades in humans (Miserocchi et al. 2008). This might explain why the pleural burden is not reflected at the same time by lung concentrations. Secondly, as black spots may have various macroscopic aspects (Muller, Schmitz, and Konstantinidis 2002), the samples may differ in their thickness and their proportion of normal pleura and it is likely that particles are heterogeneously distributed in the black spots.

The similarity in morphology and chemical composition of particles found in the pleura and lung suggest a regional translocation from the alveolar space to the pleural space, as described previously (Donaldson et al. 2010). Particles may migrate to the lung interstitium and visceral pleura by a paracellular route or by direct penetration across injured alveolar epithelial cells within macrophages or by themselves (Broaddus et al. 2011; Miserocchi et al. 2008). They could then translocate passively to the pleural space. Experimental studies have shown that pleural liquid is produced by filtration from the capillaries of the parietal pleura and may be removed by four mechanisms of decreased intensity: absorption by Starling forces into the capillaries of the visceral pleura, solute coupled liquid absorption, transcytosis, and lymphatic drainage through the stomata of the parietal pleura (Agostoni and Zocchi 2007). This last mechanism is crucial in removing particles and cells (Zocchi 2002). Indeed, stomata are oval or round openings from 2 to 10 μm in diameter allowing the passage of cells and particles. They are present and grouped mainly in the mediastinal, diaphragmatic and caudal regions of the parietal pleura (De Vuyst 1997). Their density was found to vary from 1 per mm^2 in

mediastinal region to 72 per mm² in diaphragmatic region in rabbits (Agostoni and Zocchi 2007). Milky spots are sites located around the stomata. These sites are rich by macrophages and lymphocytes and are involved in the elimination of cells and particles from the pleura. Black spots are probably formed by an accumulation of particles in these sites (De Vuyst 1997). Absorption of exogenous particles from the pleural space by the visceral pleura has also been reported previously (Pereira Ade et al. 1992) but it is rarely confirmed in more recent studies. Particles in the pleura may also come from other sources, e.g. by systemic translocation of intestinally absorbed or inhaled particles (Bonner 2010).

The translocation of particles other than fibers to human pleura and mesothelial tissues has received little attention. Thirty nm silica nanoparticles were found in the pleural liquid and mesothelial cells in Chinese female workers who suffered from shortness of breath, pleural effusion and progressive pulmonary fibrosis after several months of chronic exposure to spray-painting, suggesting regional pulmonary translocation (Song, Li, and Du 2009; Song et al. 2011). Another case report described the submesothelial peritoneal deposition of carbon nanoparticles evidenced by electron microscopy and attributed to toner exposure, raising the hypothesis of systemic translocation after exposure by inhalation (Theegarten et al. 2010).

Our findings do not shed any light on the significance of pleural translocation of fine and nanosized particles from a toxicological point of view. The link between the pleura and benign pleural plaques or malignant mesothelioma has been formally established for asbestos fibers in the pleura (Boutin et al. 1996) and is strongly suspected for carbon nanotubes (Donaldson et al. 2010). Inhaled nanotubes are also thought to be able to reach the sub-pleural tissues and induce fibrosis (Ryman-Rasmussen et al. 2009) or reach the pleural space and induce inflammation and proliferation (Xu et al. 2012). Data for other types of particle are sparse. Carbon black particles were found to be a potential cofactor in the initiation and progression of pulmonary and pleural fibrosis in mice (Decolonne et al. 2010). Moreover, pleural and peritoneal mesotheliomas have been induced in rodents following exposure to particulate nickel compounds (Kane 2006). Experimental data on combustion-derived nanoparticles (Donaldson et al. 2005) and metallic nanoparticles such as titanium dioxide nanoparticles (Shi et al. 2013) indicate that they are able to induce oxidative stress and potentially trigger a genotoxic effect, thus raising questions about their possible carcinogenicity in the pleura.

Our innovative protocol allowed us to analyze parenchyma and pleural retention of aggregated nanosized particles. Prior to the study, we conducted a preliminary phase of digestion, filtration and ultracentrifugation tests using commercial metallic and carbonaceous

particles in order to determine the most relevant protocol. We decided to use filtration despite the possible bias due to the loss of individual particles. Our preliminary data indicated that particle loss was more proportional and reproducible with filtration than with ultracentrifugation, especially for low density particles such as carbon particles. Unfortunately, this protocol is time-consuming and expensive so we had to limit the number of patients included to ten in this pilot study, which resulted in a low statistical power. This may explain why no differences between tissues were found to be significant and why no correlation was found between the concentrations in the different type of tissues. It may also be explained by topographic variations in the sampling between the patients. Indeed, both lung parenchyma retention in particles (Sebastien et al. 1980) and the effectiveness of lymphatic clearance (Egashira et al. 2013) are known to vary according to the region analyzed.

Finally, we selected patients on the basis of their lung asbestos concentrations but it has been demonstrated that asbestos-induced lung inflammation may modify translocation and retention patterns (Miserocchi et al. 2008). Thus, further analyses based on a larger prospective study collecting more detailed exposure information should be conducted to confirm the pleural retention of fine and nanosized particles in physiological conditions and to evaluate the impact of environmental or occupational exposure on such retention.

5. Conclusions

This study demonstrated that parietal pleura is able to retain inhaled fine and nanosized particles. These particles accumulate in structures known as black spots at concentrations similar to or exceeding those in the lung but without any clear correlation between these tissues. The similarities in chemical composition of particles between the lung and the parietal pleural suggested a process of translocation through the pleural space, according to present knowledge about pleural physiology. Particles found in both tissues were mainly combustion-derived nanosized particles. Whether they are able to induce inflammation or to potentiate the carcinogenicity of asbestos fibers that also concentrate in black spots remains to be established. Further investigations would be helpful to understand the kinetics of the translocation of fine and nanosized particles to the pleura and the consequences of their concentration in black spots.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements (Funding Sources)

We thank the Bordeaux Imaging center, the Cremem-Placamat and the Laboratoire d'étude des particules inhalées de la Ville de Paris for their support in the sample preparation and the TEM analyses.

We also thank Mrs Pippa McKelvie-Sebileau for his careful reading of the manuscript.

NANOTRANS study is funded by Anses - French Agency for Food (EST 09-85), Environmental and Occupational Health & Safety, the CHU de Bordeaux and the Regional Government of Aquitaine (convention 201013010007).

Reference

- AFNOR. 1995. Air des lieux de travail - Échantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Paris.
- . 2002. Air des lieux de travail - Prélèvement et dosage d'aldéhydes. Paris.
- . 2004. Air des lieux de travail. Prélèvement et analyse de gaz et vapeurs organiques. Prélèvement par pompage sur tube à adsorption et désorption par solvant.
- . 2005. Air des lieux de travail - Détermination des métaux et métalloïdes dans les particules en suspension dans l'air par spectrométrie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif.
- Agostoni, E., and L. Zocchi. 2007. Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* 159 (3):311-323.
- AIRAQ. 2015. *Report ET/PE/14/03 : Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en Aquitaine*. AIRAQ 2010 [cited 04.05.2015 2015]. Available from http://www.airaq.asso.fr/fileadmin/user_upload/redacteur/Inventaire_emissions_Aquitaine_2010_V2.0.pdf.
- Almeida, J. P., A. L. Chen, A. Foster, and R. Drezek. 2011. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 6 (5):815-835.
- Andujar, P., S. Lanone, P. Brochard, and J. Boczkowski. 2011. Respiratory effects of manufactured nanoparticles. *Rev Mal Respir* 28 (8):e66-75.
- ANSES. 2015. Pollution chimique de l'air des enceintes de transports ferroviaires souterrains et risques sanitaires associés chez les travailleurs. In *Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective*. Paris, France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 361.
- Backes, C. H., T. Nelin, M. W. Gorr, and L. E. Wold. 2013. Early life exposure to air pollution: how bad is it? *Toxicol Lett* 216 (1):47-53.
- Bakand, S., A. Hayes, and F. Dechsakulthorn. 2012. Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 24 (2):125-135.
- Balansky, R., M. Longobardi, G. Ganchev, M. Ilcheva, N. Nedyalkov, P. Atanasov, R. Toshkova, S. De Flora, and A. Izzotti. 2013. Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice. *Mutat Res* 751-752:42-48.
- Barton, H. A., V. J. Cogliano, L. Flowers, L. Valcovic, R. W. Setzer, and T. J. Woodruff. 2005. Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens. *Environ Health Perspect* 113 (9):1125-1133.
- Benbrahim-Tallaa, L., R. A. Baan, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, N. Guha, D. Loomis, K. Straif, and G. International Agency for Research on Cancer Monograph Working. 2012. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol* 13 (7):663-664.
- Bernaudin, J. F., and J. Fleury-Feith. 2006. [Structure and physiology of the pleura and the pleural space]. *Rev Pneumol Clin* 62 (2):73-77.
- Bernstein, D. M., R. A. Rogers, R. Sepulveda, K. Donaldson, D. Schuler, S. Gaering, P. Kunzendorf, J. Chevalier, and S. E. Holm. 2011. Quantification of the pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite-asbestos following short-term inhalation exposure. *Inhal Toxicol* 23 (7):372-391.
- Blum, J. L., J. Q. Xiong, C. Hoffman, and J. T. Zelikoff. 2012. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci* 126 (2):478-486.
- Bodenhofer, U., and F. Klawonn. 2008. Robust rank correlation coefficients on the basis of fuzzy orderings: Initial steps. *Mathware & Soft Computing* 15:5-20.

- Bodenhofer, U., and M. Krone. 2015. *RoCoCo: An R package implementing a robust rank correlation coefficient and a corresponding test*. Institute of Bioinformatics, Johannes Kepler University 2013 [cited 2015]. Available from <http://cran.r-project.org/web/packages/rococo/vignettes/rococo.pdf>.
- Boffetta, P., and D. T. Silverman. 2001. A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure. *Epidemiology* 12 (1):125-130.
- Bonner, J. C. 2010. Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 7 (2):138-141.
- Boutin, C., P. Dumortier, F. Rey, J. R. Viallat, and P. De Vuyst. 1996. Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study. *Am J Respir Crit Care Med* 153 (1):444-449.
- Brauer, M., C. Avila-Casado, T. I. Fortoul, S. Vedal, B. Stevens, and A. Churg. 2001. Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect* 109 (10):1039-1043.
- Broadus, V. C., J. I. Everitt, B. Black, and A. B. Kane. 2011. Non-neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14 (1-4):153-178.
- Brouwer, D. H., J. H. Gijssbers, and M. W. Lurvink. 2004. Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies. *Ann Occup Hyg* 48 (5):439-453.
- Brunner, T. J., P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink, and W. J. Stark. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol* 40 (14):4374-4381.
- Buerki-Thurnherr, T., U. von Mandach, and P. Wick. 2012. Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med Wkly* 142:w13559.
- Campagnolo, L., M. Massimiani, G. Palmieri, R. Bernardini, C. Sacchetti, A. Bergamaschi, L. Vecchione, A. Magrini, M. Bottini, and A. Pietroiusti. 2013. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol* 10:21.
- Cena, L. G., W. P. Chisholm, M. J. Keane, and B. T. Chen. 2015. A Field Study on the Respiratory Deposition of the Nano-Sized Fraction of Mild and Stainless Steel Welding Fume Metals. *J Occup Environ Hyg* 12 (10):721-728.
- Cena, L. G., M. J. Keane, W. P. Chisholm, S. Stone, M. Harper, and B. T. Chen. 2014. A novel method for assessing respiratory deposition of welding fume nanoparticles. *J Occup Environ Hyg* 11 (12):771-780.
- Chu, M., Q. Wu, H. Yang, R. Yuan, S. Hou, Y. Yang, Y. Zou, S. Xu, K. Xu, A. Ji, and L. Sheng. 2010. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. *Small* 6 (5):670-678.
- Cui, Y., X. Chen, Z. Zhou, Y. Lei, M. Ma, R. Cao, T. Sun, J. Xu, M. Huo, R. Cao, C. Wen, and Y. Che. 2014. Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere* 96:99-104.
- Curwin, B., and S. Bertke. 2011. Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace. *J Occup Environ Hyg* 8 (10):580-587.
- De Vuyst, P. 1997. [Physiopathology of pleural diseases]. *Rev Prat* 47 (12):1294-1297.
- Decologne, N., G. Wettstein, M. Kolb, P. Margetts, C. Garrido, P. Camus, and P. Bonniaud. 2010. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J* 35 (1):176-185.

- Delcourt, J., and J. Sandino. 2000. Evaluation des performances du badge GABIE® dans des atmosphères industrielles. Etude de cas. *Hygiène et sécurité du travail* 181 (Cahiers de notes documentaires):12.
- Demou, E., P. Peter, and S. Hellweg. 2008. Exposure to manufactured nanostructured particles in an industrial pilot plant. *Ann Occup Hyg* 52 (8):695-706.
- Demou, E., W. J. Stark, and S. Hellweg. 2009. Particle emission and exposure during nanoparticle synthesis in research laboratories. *Ann Occup Hyg* 53 (8):829-838.
- Di Bona, K. R., Y. Xu, P. A. Ramirez, J. DeLaine, C. Parker, Y. Bao, and J. F. Rasco. 2014. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reprod Toxicol* 50:36-42.
- Dikensoy, O., and H. Bayram. 2010. The current data on nanoparticles and pleura. *Tuberk Toraks* 58 (4):455-458.
- Dodson, R. F., and M. A. Atkinson. 2006. Measurements of asbestos burden in tissues. *Ann N Y Acad Sci* 1076:281-291.
- Donaldson, K., F. A. Murphy, R. Duffin, and C. A. Poland. 2010. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol* 7:5.
- Donaldson, K., C. A. Poland, F. A. Murphy, M. MacFarlane, T. Chernova, and A. Schinwald. 2013. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (15):2078-2086.
- Donaldson, K., L. Tran, L. A. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee, and V. Stone. 2005. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2:10.
- Dumortier, P., F. Rey, J. R. Viallat, I. Broucke, C. Boutin, and P. De Vuyst. 2002. Chrysotile and tremolite asbestos fibres in the lungs and parietal pleura of Corsican goats. *Occup Environ Med* 59 (9):643-646.
- Egashira, R., T. Tanaka, T. Imaizumi, K. Senda, Y. Doki, S. Kudo, and J. Fukuoka. 2013. Differential distribution of lymphatic clearance between upper and lower regions of the lung. *Respirology* 18 (2):348-353.
- El-Sayed, Y. S., R. Shimizu, A. Onoda, K. Takeda, and M. Umezawa. 2015. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology* 327:53-61.
- Elihn, K., and P. Berg. 2009. Ultrafine particle characteristics in seven industrial plants. *Ann Occup Hyg* 53 (5):475-484.
- Ema, M., N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, and J. Nakanishi. 2010. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol* 30 (3):343-352.
- Ema, M., M. Naya, M. Horimoto, and H. Kato. 2013. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* 42:1-17.
- Fleury Feith, J., and M. C. Jaurand. 2013. [Pleural lymphatics and pleural diseases related to fibres]. *Rev Pneumol Clin* 69 (6):358-362.
- Frohlich, E., and E. Roblegg. 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291 (1-3):10-17.
- Gatti, A. M., P. Bosco, F. Rivasi, S. Bianca, G. Ettore, L. Gaetti, S. Montanari, G. Bartoloni, and D. Gazzolo. 2011. Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:221-226.
- Geiser, M., and W. G. Kreyling. 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 7:2.

- Ghaderi, S., S. R. Tabatabaei, H. N. Varzi, and M. Rashno. 2015. Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice. *J Toxicol Sci* 40 (2):263-275.
- Glista-Baker, E. E., A. J. Taylor, B. C. Sayers, E. A. Thompson, and J. C. Bonner. 2012. Nickel nanoparticles enhance platelet-derived growth factor-induced chemokine expression by mesothelial cells via prolonged mitogen-activated protein kinase activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47 (4):552-561.
- Gomes, J. F., P. C. Albuquerque, R. M. Miranda, and M. T. Vieira. 2012. Determination of airborne nanoparticles from welding operations. *J Toxicol Environ Health A* 75 (13-15):747-755.
- Gomes, J. F., R. M. Miranda, T. J. Santos, and P. A. Carvalho. 2014. Emission of nanoparticles during friction stir welding (FSW) of aluminium alloys. *J Toxicol Environ Health A* 77 (14-16):924-930.
- Grafmueller, S., P. Manser, L. Diener, P. A. Diener, X. Maeder-Althaus, L. Maurizi, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach, and P. Wick. 2015. Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an Human Placental Perfusion Model. *Environ Health Perspect*.
- Grafmuller, S., P. Manser, H. F. Krug, P. Wick, and U. von Mandach. 2013. Determination of the transport rate of xenobiotics and nanomaterials across the placenta using the ex vivo human placental perfusion model. *J Vis Exp* (76).
- Guo, J., T. Kauppinen, P. Kyyronen, P. Heikkila, M. L. Lindbohm, and E. Pukkala. 2004. Risk of esophageal, ovarian, testicular, kidney and bladder cancers and leukemia among finnish workers exposed to diesel or gasoline engine exhaust. *Int J Cancer* 111 (2):286-292.
- Haque, A. K., D. M. Vrazel, and T. Uchida. 1998. Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas. *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (3):532-538.
- Hart, J. E., F. Laden, M. B. Schenker, and E. Garshick. 2006. Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers. *Environ Health Perspect* 114 (7):1013-1017.
- He, X., T. Reponen, R. McKay, and S. A. Grinshpun. 2014. How does breathing frequency affect the performance of an N95 filtering facepiece respirator and a surgical mask against surrogates of viral particles? *J Occup Environ Hyg* 11 (3):178-185.
- HEI. 2013. HEI Review Panel on Ultrafine Particles. In *Understanding the Health Effects of Ambient Ultrafine Particles*. Boston, MA: Health Effects Institute, 122.
- Holt, P. F. 1981. Transport of inhaled dust to extrapulmonary sites. *J Pathol* 133 (2):123-129.
- Hong, J. S., M. K. Park, M. S. Kim, J. H. Lim, G. J. Park, E. H. Maeng, J. H. Shin, M. K. Kim, J. Jeong, J. A. Park, J. C. Kim, and H. C. Shin. 2014. Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine* 9 Suppl 2:159-171.
- Hougaard, K., B. Fadeel, M. Gulumian, V. Kagan, and K. Savolainen. 2011. Developmental toxicity of engineered nanoparticles. In *Reproductive and developmental toxicology*, edited by R. Gupta. Amsterdam: Academic Press, 269-290.
- Hougaard, K. S., L. Campagnolo, P. Chavatte-Palmer, A. Tarrade, D. Rousseau-Ralliard, S. Valentino, M. V. Park, W. H. de Jong, G. Wolterink, A. H. Piersma, B. L. Ross, G. R. Hutchison, J. S. Hansen, U. Vogel, P. Jackson, R. Slama, A. Pietrojusti, and F. R. Cassee. 2015. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol* 56:118-140.
- IARC. 2012. Diesel engine exhaust carcinogenic.

- INRS. 2015. *Particules émises par des moteurs diesel*. INRS édition 2007 [cited April the 9th 2015]. Available from [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/\\$File/038.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/$File/038.pdf).
- . 2012. *Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France*. 3rd ed. Vol. ED 984. Paris: Edition INRS.
- Jackson, P., K. S. Hougaard, A. M. Boisen, N. R. Jacobsen, K. A. Jensen, P. Moller, G. Brunborg, K. B. Gutzkow, O. Andersen, S. Loft, U. Vogel, and H. Wallin. 2012. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology* 6 (5):486-500.
- Jackson, P., U. Vogel, H. Wallin, and K. S. Hougaard. 2011. Prenatal exposure to carbon black (printex 90): effects on sexual development and neurofunction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109 (6):434-437.
- Ji, X. 2010. Évaluation des expositions humaines aux particules ultrafines, Université Paris-Est École doctorale ABIES, Paris, France.
- Ji, X., O. Le Bihan, O. Ramalho, C. Mandin, B. D'Anna, L. Martinon, M. Nicolas, D. Bard, and J. C. Paireon. 2010. Characterization of particles emitted by incense burning in an experimental house. *Indoor Air* 20 (2):147-158.
- Jo, E., G. Seo, J. T. Kwon, M. Lee, B. Lee, I. Eom, P. Kim, and K. Choi. 2013. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. *J Toxicol Sci* 38 (4):525-530.
- Juch, H., L. Nikitina, P. Debbage, G. Dohr, and M. Gauster. 2013. Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues. *Reprod Toxicol* 41:73-79.
- Kane, A. B. 2006. Animal models of malignant mesothelioma. *Inhal Toxicol* 18 (12):1001-1004.
- Kannan, S., D. P. Misra, J. T. Dvonch, and A. Krishnakumar. 2006. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ Health Perspect* 114 (11):1636-1642.
- Kaufman, J., and S. Hastings. 2005. Respiratory demand during rigorous physical work in a chemical protective ensemble. *J Occup Environ Hyg* 2 (2):98-110.
- Kendall, M., and S. Holgate. 2012. Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung. *Respirology* 17 (5):743-758.
- Kirby, P. J., C. J. Shines, G. J. Taylor, R. W. Bousquet, H. C. Price, J. I. Everitt, and D. L. Morgan. 2009. Pleural effects of indium phosphide in B6C3F1 mice: nonfibrous particulate induced pleural fibrosis. *Exp Lung Res* 35 (10):858-882.
- Kong, L., M. Tang, T. Zhang, D. Wang, K. Hu, W. Lu, C. Wei, G. Liang, and Y. Pu. 2014. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *Int J Mol Sci* 15 (11):21253-21269.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, S. Takenaka, and W. Moller. 2013. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res* 46 (3):714-722.
- Kulvietis, V., V. Zalgevičienė, J. Didziapetrienė, and R. Rotomskis. 2011. Transport of nanoparticles through the placental barrier. *Tohoku J Exp Med* 225 (4):225-234.
- Kumar, P., L. Morawska, W. Birmili, P. Paasonen, M. Hu, M. Kulmala, R. M. Harrison, L. Norford, and R. Britter. 2014. Ultrafine particles in cities. *Environ Int* 66:1-10.
- Landsiedel, R., E. Fabian, L. Ma-Hock, B. van Ravenzwaay, W. Wohlleben, K. Wiench, and F. Oesch. 2012. Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol* 86 (7):1021-1060.

- Le Bihan, O., and L. Malherbe. 2007. Connaissance de la pollution par les particules submicroniques. In *Métrologie des particules*: INERIS, 67.
- Leak, L. V. 1980. Lymphatic removal of fluids and particles in the mammalian lung. *Environ Health Perspect* 35:55-75.
- Lee, Y., J. Choi, P. Kim, K. Choi, S. Kim, W. Shon, and K. Park. 2012. A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring. *Toxicol Res* 28 (3):139-141.
- Li, C., X. Li, A. K. Suzuki, Y. Zhang, Y. Fujitani, K. Nagaoka, G. Watanabe, and K. Taya. 2013. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev* 59 (2):145-150.
- Mathiesen, L., T. A. Morck, G. Zuri, M. H. Andersen, C. Pehrson, M. Frederiksen, T. Mose, E. Rytting, M. S. Poulsen, J. K. Nielsen, and L. E. Knudsen. 2014. Modelling of human transplacental transport as performed in Copenhagen, Denmark. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 115 (1):93-100.
- Melnik, E. A., Y. P. Buzulukov, V. F. Demin, V. A. Demin, I. V. Gmoshinski, N. V. Tyshko, and V. A. Tutelyan. 2013. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* 5 (3):107-115.
- Menezes, V., A. Malek, and J. A. Keelan. 2011. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Curr Pharm Biotechnol* 12 (5):731-742.
- Mercer, R. R., A. F. Hubbs, J. F. Scabilloni, L. Wang, L. A. Battelli, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, and D. W. Porter. 2010. Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol* 7:28.
- Mercer, R. R., J. F. Scabilloni, A. F. Hubbs, L. Wang, L. A. Battelli, W. McKinney, V. Castranova, and D. W. Porter. 2013. Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 10:38.
- Methner, M., L. Hodson, A. Dames, and C. Geraci. 2010. Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies. *J Occup Environ Hyg* 7 (3):163-176.
- Meunier, P. 1997. Protocole pratique de mesure et d'analyse cardiofréquence-métrique. *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)* 3:287-293.
- . 2000. Pour une modélisation des profils cardiaques de postes. *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)* 4:409-416.
- . 2010. *Cardiofréquence-métrie pratique en milieu de travail* Paris: Edition Docis.
- Midander, K., K. Elihn, A. Wallen, L. Belova, A. K. Karlsson, and I. O. Wallinder. 2012. Characterisation of nano- and micron-sized airborne and collected subway particles, a multi-analytical approach. *Sci Total Environ* 427-428:390-400.
- Misrocchi, G., G. Sancini, F. Mantegazza, and G. Chiappino. 2008. Translocation pathways for inhaled asbestos fibers. *Environ Health* 7:4.
- Mitchev, K., P. Dumortier, and P. De Vuyst. 2002. 'Black Spots' and hyaline pleural plaques on the parietal pleura of 150 urban necropsy cases. *Am J Surg Pathol* 26 (9):1198-1206.
- Mohammadipour, A., A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, M. Hosseini, and A. E. Bideskan. 2014. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* 37 (2):617-625.
- Mohammed-Brahim, B., and A. Garrigou. 2009. Une approche critique du modèle dominant de prévention du risque chimique. L'apport de l'ergotoxicologie. *Activités* 6 (1):49-67.
- Moller, P., L. Mikkelsen, L. K. Vesterdal, J. K. Folkmann, L. Forchhammer, M. Roursgaard, P. H. Danielsen, and S. Loft. 2011. Hazard identification of particulate matter on

- vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis. *Crit Rev Toxicol* 41 (4):339-368.
- Morgan, W. K., R. B. Reger, and D. M. Tucker. 1997. Health effects of diesel emissions. *Ann Occup Hyg* 41 (6):643-658.
- Muller, K. M., I. Schmitz, and K. Konstantinidis. 2002. Black spots of the parietal pleura: morphology and formal pathogenesis. *Respiration* 69 (3):261-267.
- Murphy, F. A., C. A. Poland, R. Duffin, K. T. Al-Jamal, H. Ali-Boucetta, A. Nunes, F. Byrne, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Li, S. J. Mather, A. Bianco, M. Prato, W. Macnee, W. A. Wallace, K. Kostarelos, and K. Donaldson. 2011. Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am J Pathol* 178 (6):2587-2600.
- Murphy, F. A., A. Schinwald, C. A. Poland, and K. Donaldson. 2012. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 9:8.
- Myllynen, P. K., M. J. Loughran, C. V. Howard, R. Sormunen, A. A. Walsh, and K. H. Vahakangas. 2008. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* 26 (2):130-137.
- Nikula, K. J., K. J. Avila, W. C. Griffith, and J. L. Mauderly. 1997. Sites of particle retention and lung tissue responses to chronically inhaled diesel exhaust and coal dust in rats and cynomolgus monkeys. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5:1231-1234.
- NIOSH. 2003. Monitoring of Diesel Particulate Exhaust in the Workplace. In *Manual of Analytical Methods (NMAM)*, edited by P. O'Connor and P. Schlecht. Cincinnati: NIOSH.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113 (7):823-839.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, and C. Cox. 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16 (6-7):437-445.
- Ostiguy, C., G. Lapointe, L. Ménard, Y. Cloutier, M. Trottier, M. Boutin, M. Antoun, and C. Normand. 2006a. Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures. In *Studies and Research Projects*. Montreal: IRSST, 100.
- Ostiguy, C., G. Lapointe, L. Ménard, Y. Cloutier, M. Trottier, M. Boutin, M. Antoun, and C. Normand. 2006b. Nanoparticles. Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures. Montreal: IRSST, 100p.
- Paasonen, P., A. Visshedjik, K. Kupiainen, Z. Klimont, H. Denier van der Gon, and M. Kulmala. 2013. Aerosol particle number emissions and size distributions: Implementation in the GAINS model and initial results. Laxenburg, Austria: IIASA International Institute for Applied Systems Analysis, 28.
- Penconek, A., P. Drazyk, and A. Moskal. 2013. Penetration of diesel exhaust particles through commercially available dust half masks. *Ann Occup Hyg* 57 (3):360-373.
- Pereira Ade, S., N. R. Grande, E. Carvalho, and A. Ribeiro. 1992. Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma. *Acta Anat (Basel)* 145 (4):416-419.
- Pietrojusti, A., L. Campagnolo, and B. Fadeel. 2013. Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. *Small* 9 (9-10):1557-1572.

- Powell, J. J., N. Faria, E. Thomas-McKay, and L. C. Pele. 2010. Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract. *J Autoimmun* 34 (3):J226-233.
- Pradeau, C., V. Rondeau, E. Leveque, P. Y. Guernion, E. Tentillier, M. Thicoipe, and P. Brochard. 2015. Air pollution and activation of mobile medical team for out-of-hospital cardiac arrest. *Am J Emerg Med* 33 (3):367-372.
- Qi, W., J. Bi, X. Zhang, J. Wang, J. Wang, P. Liu, Z. Li, and W. Wu. 2014. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep* 4:4352.
- Rattanapinyopituk, K., A. Shimada, T. Morita, M. Sakurai, A. Asano, T. Hasegawa, K. Inoue, and H. Takano. 2014. Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles. *J Vet Med Sci* 76 (3):377-387.
- Refuerzo, J. S., B. Godin, K. Bishop, S. Srinivasan, S. K. Shah, S. Amra, S. M. Ramin, and M. Ferrari. 2011. Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. *Am J Obstet Gynecol* 204 (6):546.e545-549.
- Rinaldo, M., P. Andujar, A. Lacourt, L. Martinon, M. Canal Raffin, P. Dumortier, J. C. Pairon, and P. Brochard. 2015. Perspectives in Biological Monitoring of Inhaled Nanosized Particles. *Ann Occup Hyg*.
- Ristovski, Z. D., B. Miljevic, N. C. Surawski, L. Morawska, K. M. Fong, F. Goh, and I. A. Yang. 2012. Respiratory health effects of diesel particulate matter. *Respirology* 17 (2):201-212.
- Rudell, B., M. C. Ledin, U. Hammarstrom, N. Stjernberg, B. Lundback, and T. Sandstrom. 1996. Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust. *Occup Environ Med* 53 (10):658-662.
- Ryman-Rasmussen, J. P., M. F. Cesta, A. R. Brody, J. K. Shipley-Phillips, J. I. Everitt, E. W. Tewksbury, O. R. Moss, B. A. Wong, D. E. Dodd, M. E. Andersen, and J. C. Bonner. 2009. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat Nanotechnol* 4 (11):747-751.
- Sargent, L. M., D. W. Porter, L. M. Staska, A. F. Hubbs, D. T. Lowry, L. Battelli, K. J. Siegrist, M. L. Kashon, R. R. Mercer, A. K. Bauer, B. T. Chen, J. L. Salisbury, D. Frazer, W. McKinney, M. Andrew, S. Tsuruoka, M. Endo, K. L. Fluharty, V. Castranova, and S. H. Reynolds. 2014. Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol* 11:3.
- Saunders, M. 2009. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1 (6):671-684.
- Schmid, O., W. Moller, M. Semmler-Behnke, G. A. Ferron, E. Karg, J. Lipka, H. Schulz, W. G. Kreyling, and T. Stoeger. 2009. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* 14 Suppl 1:67-73.
- Seaton, A., J. Cherrie, M. Dennekamp, K. Donaldson, J. F. Hurley, and C. L. Tran. 2005. The London Underground: dust and hazards to health. *Occup Environ Med* 62 (6):355-362.
- Sebastien, P., X. Janson, A. Gaudichet, A. Hirsch, and J. Bignon. 1980. Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura. *IARC Sci Publ* (30):237-246.
- Semmler-Behnke, M., J. Lipka, A. Wenk, S. Hirn, M. Schaffler, F. Tian, G. Schmid, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2014. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol* 11 (1):33.
- Shepard, M. N., and S. Brenner. 2014. An occupational exposure assessment for engineered nanoparticles used in semiconductor fabrication. *Ann Occup Hyg* 58 (2):251-265.

- Shi, H., R. Magaye, V. Castranova, and J. Zhao. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 10:15.
- Song, Y., X. Li, and X. Du. 2009. Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J* 34 (3):559-567.
- Song, Y., X. Li, L. Wang, Y. Rojanasakul, V. Castranova, H. Li, and J. Ma. 2011. Nanomaterials in humans: identification, characteristics, and potential damage. *Toxicol Pathol* 39 (5):841-849.
- Sonnegaard Poulsen, M., T. Mose, L. Leth Maroun, L. Mathiesen, L. Ehlert Knudsen, and E. Rytting. 2013. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. *Nanotoxicology*.
- Stieb, D. M., L. Chen, M. Eshoul, and S. Judek. 2012. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res* 117:100-111.
- Sydbom, A., A. Blomberg, S. Parnia, N. Stenfors, T. Sandstrom, and S. E. Dahlen. 2001. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* 17 (4):733-746.
- Takahashi, Y., K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio, and K. Takeda. 2010. Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. *J Toxicol Sci* 35 (5):749-756.
- Takeda, K., K.-i. Suzuki, A. Ishihara, M. Kubo-Irie, R. Fujimoto, M. Tabata, S. Oshio, Y. Nihei, T. Ihara, and M. Sugamata. 2009. Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *J. Health Sci* 55 (1):95-102.
- Theegarten, D., S. Boukercha, S. Philippou, and O. Anhenn. 2010. Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report. *Diagn Pathol* 5:77.
- Tian, X., M. Zhu, L. Du, J. Wang, Z. Fan, J. Liu, Y. Zhao, and G. Nie. 2013. Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy. *Small* 9 (14):2432-2439.
- Tsyganova, N. A., R. M. Khairullin, G. S. Terentyuk, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, S. N. Erykov, and N. G. Khlebtsov. 2014. Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier. *Bull Exp Biol Med* 157 (3):383-385.
- Umezawa, M., H. Tainaka, N. Kawashima, M. Shimizu, and K. Takeda. 2012. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J Toxicol Sci* 37 (6):1247-1252.
- WHO. 2013. Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, 122.
- Wichmann, H. E. 2007. Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1:241-244.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, and U. von Mandach. 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118 (3):432-436.
- Wu, J., C. Yu, Y. Tan, Z. Hou, M. Li, F. Shao, and X. Lu. 2015. Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats. *Environ Res* 138c:67-73.
- Xu, J., M. Futakuchi, H. Shimizu, D. B. Alexander, K. Yanagihara, K. Fukamachi, M. Suzui, J. Kanno, A. Hirose, A. Ogata, Y. Sakamoto, D. Nakae, T. Omori, and H. Tsuda. 2012. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci* 103 (12):2045-2050.
- Xu, Y., L. Barregard, J. Nielsen, A. Gudmundsson, A. Wierzbicka, A. Axmon, B. A. Jonsson, M. Karedal, and M. Albin. 2013. Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study. *Part Fibre Toxicol* 10:60.
- Yamashita, K., Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T.

- Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, and Y. Tsutsumi. 2011. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 6 (5):321-328.
- Yang, H., C. Sun, Z. Fan, X. Tian, L. Yan, L. Du, Y. Liu, C. Chen, X. J. Liang, G. J. Anderson, J. A. Keelan, Y. Zhao, and G. Nie. 2012. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep* 2:847.
- Yang, W., J. I. Peters, and R. O. Williams, 3rd. 2008. Inhaled nanoparticles--a current review. *Int J Pharm* 356 (1-2):239-247.
- Yoshida, S., K. Hiyoshi, S. Oshio, H. Takano, K. Takeda, and T. Ichinose. 2010. Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring. *Fertil Steril* 93 (5):1695-1699.
- Zimmer, A. T., and A. D. Maynard. 2002. Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates. *Ann Occup Hyg* 46 (8):663-672.
- Zocchi, L. 2002. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J* 20 (6):1545-1558.

Figures

Figure 1: Examples of micrographs of lung (a), normal pleura (b) and black spots samples (c) from the same patient (magnitude $\times 30.000$, black bar = 200 nm). White arrows show examples of particles; black arrows show a hole in the filter.

Figure 2: Concentration of particles across sample types for all patients. Patients are ranked in order of decreasing concentrations in lung samples.

Figure 3: Composition of particles according to size.

Figure 4: a) Mineral and b) metallic composition of particles (percentage)

Figure 5: Micrograph and associated spectra of aggregates of: a) carbon ($\times 25.000$) and b) titanium ($\times 30.000$).

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Annals of Occupational Hygiene

Manuscript ID AnnHyg-15-0234

Title Characterization of occupational exposure to particles and chemicals emitted during ra grinding maintenance in the Paris metro: a multidisciplinary approach.

Authors Rinaldo, Mickael
Bonga Bona, Kety
Bouvier, Ghislaine
Canal Raffin, Mireille
Jouannique, Valérie
Lacourt, Aude
Lecoin, Laurent
Mohammed-Brahim, Brahim
Pasquereau, Pierrick
Sellier, Elisabeth
Brochard, Patrick
Garrigou, Alain

Date Submitted 22-Nov-2015

Author Dashboard

Characterization of occupational exposure to particles and chemicals emitted during rail grinding maintenance in the Paris metro: a multidisciplinary approach.

Mickael Rinaldo^{1,4}, Keti Bonga Bouna⁵; Ghislaine Bouvier^{3,4}, Mireille Canal-Raffin^{3,4}, Valérie Jouannique⁵, Aude Lacourt^{3,4}, Laurent Lecoin⁵, Brahim Mohammed-Brahim⁷, Pierrick Pasquereau⁶, Elisabeth Sellier⁸, Patrick Brochard^{2,3,4} Alain Garrigou^{2,3,6}

¹ Institut universitaire romand de Santé au Travail, Lausanne Suisse, ² CHU de Bordeaux, Bordeaux France, ³ Université de Bordeaux, Bordeaux France, ⁴ INSERM, U897 Bordeaux France, ⁵ Service médical de la RATP, Paris France, ⁶ Institut Universitaire de technologie, Talence France, ⁷ Association de Santé au Travail Interservices, Toulouse, ⁸ Cremem-Placamat UMS 3626 87, Pessac France.

CORRESPONDING AUTHOR

Name: Mickael RINALDO

Postal address: Institut universitaire romand de Santé au Travail. Route de la corniche 2 CH-1066 Epalinges-Lausanne.

E-mail: Mickael.rinaldo@chuv.ch

Tel: 00 41 21 314 74 21 Fax: 00 41 21 314 74 30

CONFLICT OF INTEREST

The study presented in this article was funded by the Parisian subway company (RATP) and was supervised by an independent scientific committee. Drs Valérie Jouannique, Keti Bonga Bouna and Laurent Lecoin are occupational physicians in the occupational medicine department of the RATP.

The other authors declare no conflict of interest.

NUMBER OF WORDS: (4457/5000)

Abstract (229 words)

Ultrafine particles may be produced in the workplace by processes involving combustion, welding or grinding. A multidisciplinary study was conducted to assess occupational exposure during rail grinding maintenance in the Parisian subway system over two nights in October 2011.

Personal breathing zone sampling was performed on three workers to measure inhalable dust, metallic compounds, diesel particles, particulate and gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons, formaldehyde and benzene. Particle emission was monitored using condensation particle counters and air samples were collected for transmission electron microscopy with energy-dispersive X-Ray analysis. The physical demand of the tasks was characterized with a PolarTeam cardio frequency meter.

Individual samples revealed that concentrations of inhalable dust were almost always under 10% of the occupational exposure limits (OEL) for all operators assessed. Exposure to metals was less than 2% of the OEL in all cases. On the contrary, diesel particle emissions almost reached the maximum acceptable exposure according to railway worker guidelines. Particles emitted were mainly aggregates of carbonaceous ultrafine particles with peaks of concentration of total ultrafine particles reaching 550000 p/cm^3 (compared to baseline of $<25000 \text{ particles/cm}^3$). No ultrafine metallic particles were found.

We found a high level of physical demand for some workers that probably increased respiratory absorption and decreased respirator efficiency. Overall, the main exposures recorded were for ultrafine diesel particle emissions and not for metal exhausts emitted by the grinding as initially hypothesized.

KEY WORDS

Ultrafine Particles; Diesel particles; Electron microscopy; Rail grinding process; Subway emissions; Exposure assessment

Abbreviations

CPC: Condensation Particle Counter

EDX: Energy Dispersive X-ray analysis

EGA – FID: Evolved Gas Analysis with Flame Ionization Detection

GC-FID Gas Chromatography Flame Ionization Detection

HPLC-DAD: High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector

HPLC-Fluo: HPLC with Fluorescence Detector

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

NIOSH: National Institute for Occupational Safety and Health

OEL: Occupational exposure limits

PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbon

SEM: Scanning Electron Microscopy

TEM: Transmission Electron Microscopy

1. Introduction

Ultrafine particles are particulate matter with nanoscale dimensions (less than 100 nm in diameter). Compared with larger-sized particles, they may have a higher potential for lung deposition and translocation to other parts of the body (HEI 2013) and properties such as increased reactive surface or ability to adsorb chemicals. These properties imply a greater potential for adverse health impacts (Kumar et al. 2014; WHO 2013). Human exposure may result from atmospheric pollution mainly induced by road transport (over 60% of the total ultrafine particle emissions), followed by non-road transport (about 19%) and domestic combustion (about 13%) (Paasonen et al. 2013). The toxicity of ultrafine particles from atmospheric pollution has been demonstrated in epidemiological studies demonstrating a greater incidence of pulmonary diseases (pneumonia, asthma, chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer)(Kendall and Holgate 2012) as well as cardiovascular morbidity and mortality (Ostiguy et al. 2006b; Yang, Peters, and Williams 2008). Human exposure may also be related to occupational activities. There are increasing reports of ultrafine particle measurement in the workplace. They may be emitted by various processes such as combustion (vehicle exhaust emission), smelting, welding, laser ablation and mechanical processes like cutting, polishing or grinding (Brouwer, Gijsbers, and Lurvink 2004).

Grinding is used in railway maintenance to extend rail and track component life. Over time, track distortion can result in an increased risk of accidents and possible noise or vibrations, causing discomfort for users or people living within the vicinity of the tracks. In France, 8000 workers are involved in track maintenance of the Parisian metro, but there is limited data available on their occupational exposure to chemical hazards during maintenance work (ANSES 2015).

In 2009, at the request of the employees, the institutional Committee for Hygiene, Safety and Working Conditions of the Parisian metro company contacted the occupational health department regarding its concerns on the occupational exposure of workers during rail grinding activities. As exposure was not documented in literature, the occupational physician team commissioned a study to characterize the emission of ultrafine particles during rail grinding maintenance and the possible exposure to dusts and chemical exhausts. The aim of this study was to assess occupational exposure especially to ultrafine particles during rail grinding maintenance in the Parisian subway system over two nights in October 2011. This assessment included personal breathing zone sampling for particulate and gaseous chemicals, characterization of ultrafine particles emission and ergonomic analyses of activities.

2. Material and methods

To complement the regulatory occupational hygiene samplings that may be insufficient to assess the health risks related to ultrafine particle emissions (Brouwer, Gijbers, and Lurvink 2004), we built a research project directed by an independent scientific committee and a steering committee. Our research team involved industrial hygienists, occupational physicians and ergonomists in a multidisciplinary approach. As our study was an observational study, given the French law and the definitions of the European Directive 2001/20/EC, the approval of an Ethic committee was not requested.

2.1. Pilot study

A pilot study with ergonomic activity analyses and preliminary industrial hygiene samplings was carried out in two different Parisian metro stations over two consecutive nights in 2009. The results suggested that metallic exhausts such as iron exhausts were emitted during grinding. They also revealed that the potentially highest exposures that may be interesting for further analyses were the exposures of the driver of the grinding train and the operators who follow the train.

In this paper, we present the results of the measurement campaign performed in 2011 on the nights of the 25th and 26th of October including exposure assessment to gaseous and particulate emission, measurements, characterization of ultrafine particle emission and ergonomic analyses of workers' activities in one section on two different lines of the Parisian metro. These line sections were chosen for their topography or because of the poor distribution of the ventilation ensuring the worst scenario of exposure.

2.2. Process description

Firstly, the occupational physicians informed the workers about the study, and obtained their informed consent for ergonomic analyses and air samplings. A preparation meeting was organized at both sites with the persons in charge of production, maintenance and security of the metro line, the metro line operators and the grinding train operators. After information on the analyses was given to the workers, they were equipped with personal sampling material or the cardiac frequency thoracic belt for ergonomic analyses for the two study nights. The chosen section of the line was then carefully checked by the metro line operators to eliminate potentially ignitable waste and to protect elements such as rail electric cables. After ventilation and power supply of the track section was cut, a grinding train was brought to the track. A diesel engine ensured the train movement and an accessory diesel engine ensured the

operating of a grinding trolley composed of six grinding units (three per rail). An initial round trip without grinding was done to measure the characteristics of the rail and to determine the number of grinding round-trips required. During the grinding, the driver of the train was in a pressurized and air filtered cab. Several operators followed the train. The operator from the grinding company (hereafter named the grinding verifier) checked the grinding process and occasionally entered the cab to interact with the driver. The others (one or more operators) from the metro company (hereafter named the metro verifiers) verified the overall situation in the metro, picked up and removed any grinding scoria present and dealt with any safety issues such as a small fire that broke out. Other operators of the metro company stayed on the platform to conduct surveillance. All of these operators were equipped with P3 filtering facepiece half-mask respirators (A P3 European norm certification is given when filtration efficiency toward particles is higher than 99%).

2.3. Personal samplings

2.3.1. Sampling strategy

Personal breathing zone sampling was performed during the maintenance on three employees: the driver and the grinding verifier the first night and the driver and one of the metro verifiers on the second. The operators held a backpack containing all the sampling material. Air samples were collected by AirChek XR5000 (SKC, Inc) personal air sampling pumps set at a flow rate of 2 l/min with quartz fiber filters of 37 mm of diameter to measure inhalable dust, metallic compounds (Al, Cr, Fe, Ni, Pb, Zn) following norm NF ISO 15202-3 (AFNOR 2005), diesels particles following NIOSH 5040 methods (NIOSH 2003), and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following norm NF X 43-294 (AFNOR 1995). Air samples for gaseous PAHs were performed using a pump set at flow rate of 0.3 l/min and an Amberlite XAD[®]-2 media filter. Formaldehyde samples were made with a Pocket Pump[®] (SKS, Inc) set at a flow rate of 0.1 l/min with a filter of silica gel coated with 2.4 Dinitrophenylhydrazine and with a Radiello[®] (Sigma-Aldrich[®]) diffusive sampling system following norm NF X 43-264 (AFNOR 2002). Benzene was measured with a Pocket Pump[®] (SKS, Inc) set at flow rate of 0.1 l/min with an activated carbon filter and with a Gabie[®] diffusive sampling system developed by the French Institut National de Recherche de Sécurité (Delcourt and Sandino 2000) following norm NF X 43-267 (AFNOR 2004).

2.3.2. Analytical methods

Inhalable dust was measured by gravimetry of the filters. Metals in the dust were analyzed after microwave extraction with nitric and fluorhydric acid with inductively coupled plasma

atomic emission spectroscopy for Cr and Pb, and with inductively coupled plasma mass spectrometry for Al, Fe, Ni, Zn. Diesel particles were analyzed by evolved gas analysis with flame ionization detection (EGA – FID). PAHs were analyzed with HPLC with fluorescence detector (HPLC-Fluo). Formaldehyde was analyzed with high-performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD). Benzene was analyzed with gas chromatography flame ionization detection (GC-FID). The analytical methods used and the corresponding limits of quantification are summarized in Table 1.

Table 1. Analytical methods and limits of quantification

Inhalable dusts	Diesel particles	Metals in inhalable dusts		Formaldehyde	Benzene	Polycyclic aromatic hydrocarbon		
		IPC - AES	ICP - MS			HPLC - DAD	GC - FID	Particulate
0.20 mg	EGA – FID	Al : 2.5 µg	Cr : 0.25 µg	0.1 µg	4.09 µg	Naphthalene	10 ng	50 ng
	OC : 15µg	Fe : 25 µg	Pb : 0.25 µg			2-methylnaphtalene	10 ng	50 ng
	TC : 15 µg		Zn : 2.5 µg			Acenaphthylene	10 ng	25 ng
			Ni : 1 µg			Fluorene	10 ng	10 ng
						Phenanthrene	10 ng	10 ng
						Anthracene	10 ng	10 ng
						Fluoranthene	10 ng	10 ng
						Pyrene	10 ng	10 ng
						2-methylfluoranthene	10 ng	25 ng
						Benzo[α]anthracene	10 ng	10 ng
						Chrysene	10 ng	10 ng
						Benzo[j]fluoranthene	10 ng	10 ng
						Benzo[e]pyrene	3 ng	3 ng
						Benzo[β]fluoranthene	10 ng	10 ng
						Benzo[k]fluoranthene	10 ng	10 ng
						Benzo[α]pyrene	3 ng	3 ng
						Dibenzo[α. h]anthracene	10 ng	3 ng
						Benzo[g.h.i]perylene	10 ng	10 ng
						Indeno[1.2.3.cd]pyrene	10 ng	10 ng

*EC: Elemental carbon, OC: organic carbon, TC: total carbon, PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbon, EGA – FID: evolved gas analysis with flame ionization detection, ICP-AES inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry, HPLC-DAD: high-performance liquid chromatography with photodiode array detector, GC-FID: gas chromatography flame ionization detection, HPLC-Fluo : HPLC with fluorescence detector.

2.4. Characterization of fine and ultrafine particle emissions

A research protocol was drafted and validated by the scientific committee using the American National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) guidelines for nanoparticle emission assessment techniques for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials (Methner et al. 2010).

2.4.1. Sampling strategy

Quantitative analyses were performed with two condensation particle counters (CPC) 3007[®] (TSI, USA), enabling particle detection in the range of 0.01 to 1 μm . The first CPC was placed in the cab of the grinding train and the second one on the platform. For transmission electron microscopy (TEM) analyses, air samples were collected using AirChek XR5000 (SKC, Inc) personal air sampling pumps set at a flow rate of 2 l/min with pre-carbonated 37 mm polycarbonate filters with a pore size of 0.2 μm (Whatman). To ensure that the filters were not saturated, several durations of sampling from 1 to 8 min were used, based on the results of the previous measurements done with CPC during the pilot study. Ten samples were collected in the cab of the grinder train and on the platform: two before grinding on the first night to assess the background, four samples during grinding on the first night and four during grinding on the second night. Additional scanning electron microscopy (SEM) analyses were performed on grinding scoria collected after the grinding.

2.4.2. Characterization with transmission and scanning electron microscopies (TEM and SEM)

For TEM analyses, the filters were carbon-coated with a carbon evaporator. The particles trapped between the two layers of carbon were then transferred to a TEM copper-indexed 200 mesh grid. A piece of filter was deposited on two grids placed on Whatman filter paper imbibed with 2 ml chloroform in a closed Petri dish until total evaporation to dissolve the polycarbonate filter. The grids were analyzed under a transmission electron microscope (JEOL 2100 LaB6) equipped with an energy-dispersive X-Ray analysis (EDX) system (IDFix 12.2.1, SAM'X). This EDX microanalysis system collects the X-rays generated by the interaction between the surface of the sample and the electron beam, then sorts and plots them by energy in order to produce a spectrum in which elements with an atomic number greater than boron are detected. EDX analyses were conducted at an accelerating voltage of 200 kv, 7° tilt angle using collection times of 60-200 s.

Grids were first examined at low magnitude between x80 and x1000 to check quality and uniformity. Then openings were analyzed randomly at x30 000. Particles detected were

classified according to their size in four classes (<50 nm, 50-100 nm, 100-500 nm, >500 nm) and their aspect (individual particles and aggregates). Analyses were made either on 50 particles or on all particles found on 5 opening grids in case of filters with a low number of particles. To complete these analyses, fragments of the scoria were cut, attached with double-sided tape on aluminum SEM stub specimens without coating and analyzed with a scanning electron microscope (ZEISS EVO 50 LaB6) equipped with an EDX system (IDFix 12.2.1, SAM'X) with an accelerating voltage of 15 kV.

2.5. Characterization of the physical demand

The physical demand of the tasks was characterized with a PolarTeam cardio frequency meter. This thoracic belt was worn by the operators (driver and all verifiers) for the full duration of maintenance activities over the two nights. The heart rate data were interpreted by an ergonomist with the Propulse Ergo software (Propulse Ergo, CardiSport). The mean level of physical demand intensity was calculated using the Meunier method and classified as light, moderate, rather heavy, heavy or very heavy as described in table 1 of the supplemental information (Meunier 1997, 2000, 2010).

3. Results

3.1. Personal sampling

On the first night we sampled the exposure of the driver and the grinding verifier for the duration of the grinding activities (1 hr 39 min). On the second night, we sampled the driver for the duration of the grinding (2 hr 20 min) and the metro verifier during the grinding and his checking of the railway tracks (3 hr 30 min).

3.1.1. Particulate fraction sampling

A summary of personal sampling results for the particulate fraction are presented in table 2. Level of inhalable dust concentration varied according to activity, and was three times higher for the grinding verifier compared with the other operators. The grinding verifier also had the highest exposure to iron, being exposed to a concentration more than three times higher than for the other operators (0.89 mg/m³). On the contrary, the worker the most exposed to aluminum was the metro verifier, at a concentration of 0.44 mg/m³, three times higher than for the other operators. Traces of chromium were found only for the grinding operator. Other metals (nickel, lead, zinc) were under the limits of detection. The grinding verifier was

exposed to a level of diesel particles that was twice as high as for the other operators (1.29 mg/m³) with a slight predominance of elemental carbon.

Table 2. Summary of personal sampling results for particulate fraction, during grinding operation in the Paris subway, October 2011

Pollutants	Grinding verifier	Driver		Metro verifier
	1 st night mg/m ³	1 st night mg/m ³	2 nd night mg/m ³	2 nd night mg/m ³
Inhalable dust	4.68	1.36	1.28	1.57
Iron	0.89	<0.13	0.1	0.3
Aluminum	0.17	0.14	0.13	0.44
Nickel	<0.005	<0.005	<0.004	<0.003
Chromium	0.003	<0.0013	<0.0009	<0.0007
Lead	<0.0013	<0.0013	<0.0009	<0.0007
Zinc	<0.012	<0.013	<0.009	<0.0067
Elemental carbon	0.7	0.32	0.09	0.25
Organic carbon	0.59	0.33	0.17	0.32
Total Carbon	1.29	0.65	0.26	0.57

Eight-hour time weighted values were calculated in order to compare our results to occupational exposure limits (OEL) (INRS 2012)). These results are presented in table 3.

Table 3: Comparison of 8-hr time-weighted particle exposure during grinding operation with occupational exposure limits (OEL) for France

Pollutants	OEL (mg/m ³)	Grinding verifier		Driver		Metro verifier	
		1 st night % OEL	1 st night % OEL	2 nd night % OEL	2 nd night % OEL		
Inhalable dust	10	10	2.8	3	6		
Iron	10	1.8	< LOD	0.3	1		
Aluminum	10	0.35	0.4	0.3	2		
Nickel	1	< LOD*	< LOD	< LOD	< LOD		
Chromium	2	0.04	< LOD	< LOD	< LOD		
Lead	0.1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD		
Zinc	10	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD		
Total carbon	0.3	90	43	27	73		

*LOD: Limit of detection

Given the limited duration of the grinding process (less than 2 hrs 30 min), exposure to inhalable dust for all operators was much lower than the OEL, reaching at most 10% of the OEL. Exposure to metals never exceeded 2% of the OEL. Exposure to diesel particles almost reached the maximum limits of the guidelines defined by National Research and Safety Institute (INRS) for occupational accidents prevention in France (INRS 2007) for the grinding verifier (90% of the OEL) but this was lower for the metro verifier (73% of the OEL). Exposure in the cabin varied from 27 to 43% of the OEL.

3.1.2. Gaseous fraction

Levels of benzene and formaldehyde were under the limits of detection. The PAH analyses were positive only for naphthalene in the cabin but largely under the recommended maximum occupational exposure limit of 50 mg/m³ (0.845 µg/m³ on the 1st night and 0.737 µg/m³ on the 2nd night). All other PAHs were below the limits of detection.

3.2. Characterization of fine and ultrafine particle emissions

3.2.1. Particle concentration

Particle counts across the two nights of observation are presented in figure 1.

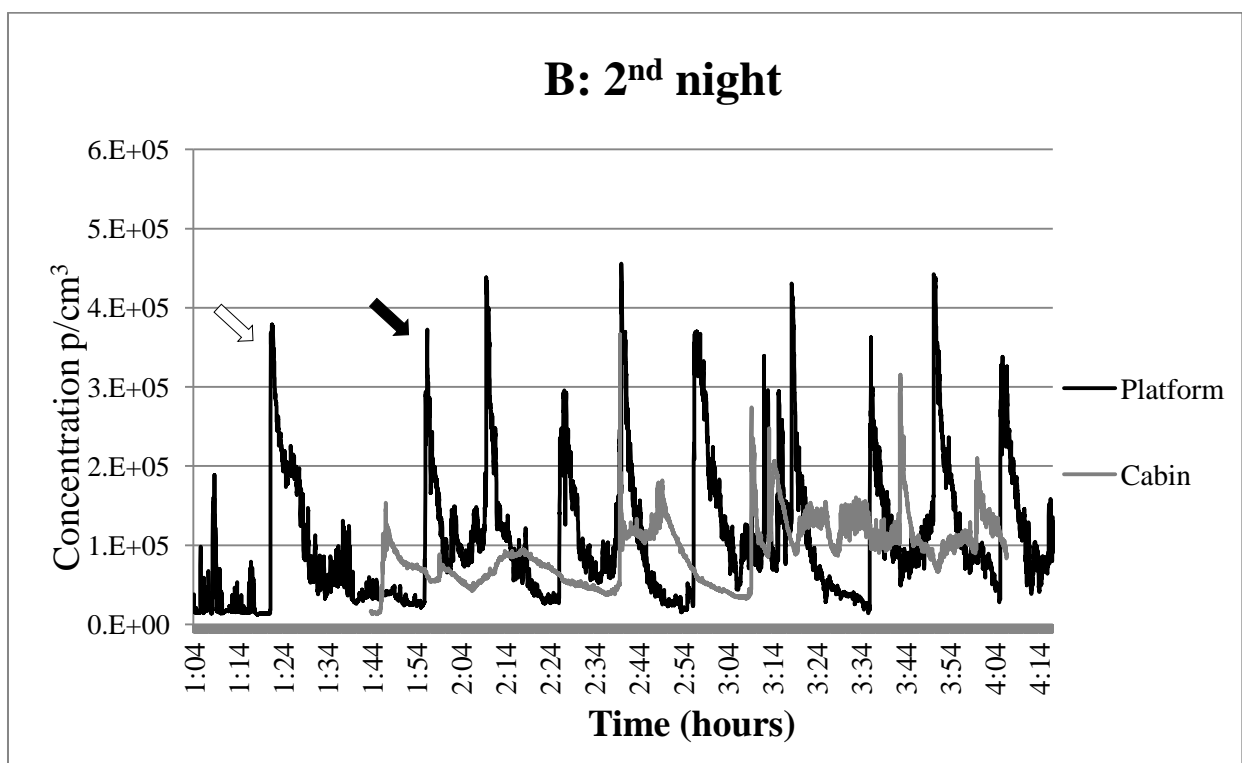
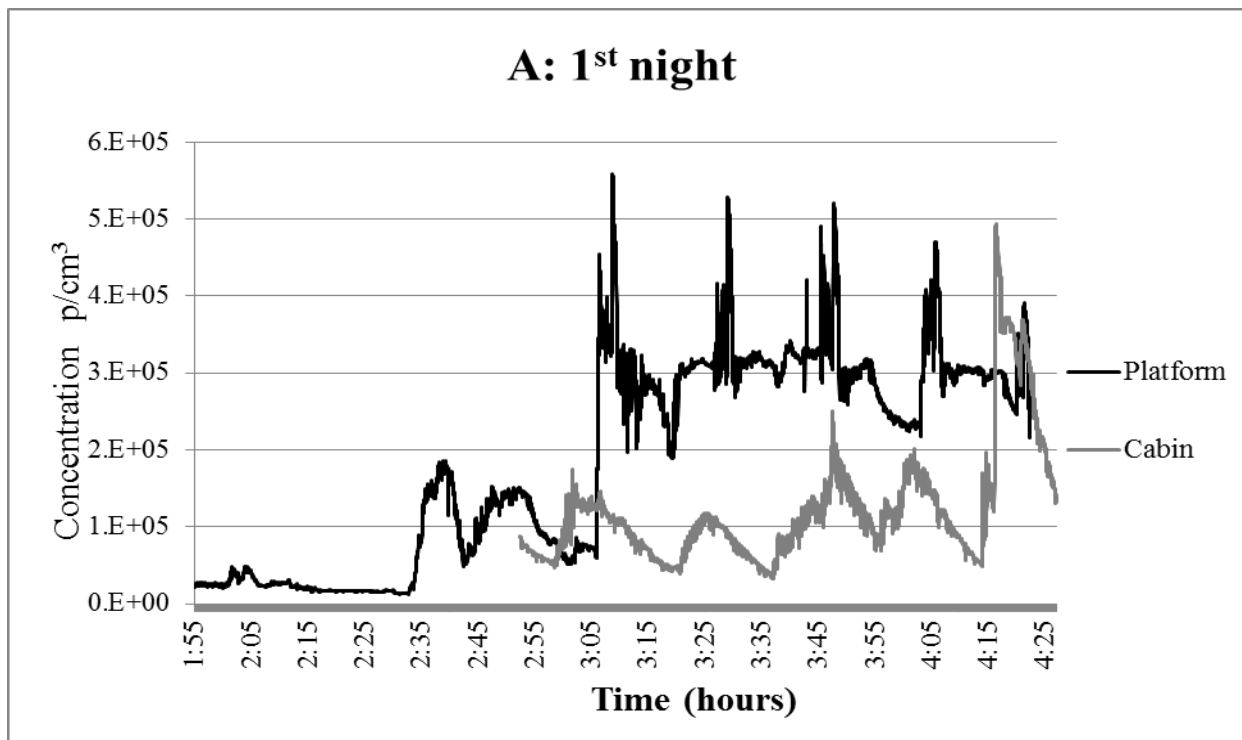


Figure 1: Air particle counts during grinding operations, (A: first night the 24th of October 2011, B: 2nd night the 25th of October 2011).

Background levels of particles on the platform and the cabin were comprised between 15 000 and 25 000 particles/cm³. On the platform, particle emission peaks were observed each time the grinding train came into the station. The intensity of the peaks were similar irrespective of

whether the train's passage was during the grinding (peak at 1:56am on the 2nd night, black arrow) or not during the grinding (peak at 1:24 on the 2nd night, white arrow). These peaks exceeded 550 000 p/cm³ on the first night and 450 000p/cm³ on the second. The peaks were also be related to other activities such as the passage of a metro train on the opposite platform observed during the second night at 1:09am which induced a peak of about 200 000 p/cm³. The peaks were followed by a rapid reduction within ten seconds with stabilization around 250 000 p/cm³ the first night and 100 000 p/cm³ the second night. In the cabin, the peaks observed were related to the opening of the driver's door, when the grinding verifier had to interact with the driver. Particle concentration reached 500 000 p/cm³ on the first evening and 350 000 p/cm³ on the second. In the cabin, the reduction in concentration was more progressive, reaching stabilization around 100 000 p/cm³ within minutes.

3.2.2. Transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM) analyses

The detailed sampling characteristics for TEM analyses are presented in supplementary table 2. More than 85% of the particles observed were aggregates. These aggregates mostly exceeded 100 nm and were made of individual particles of about 20 to 30 nm, with the typical aspects of diesel emission particles. EDX analyses confirmed that more than 99% of the particles on the filters were carbonaceous particles. Examples of micrographs with associated spectra of two carbonaceous particles are presented in figure 2. The spectra for these particles showed a main peak of carbon with, in some cases, other peaks of trace elements like arsenic, lead, and sulfur.

Before grinding, no particles smaller than 100 nm were found in the filter from the cabin and 20 % of the particles found in the filter from the platform were smaller than 100 nm. During the grinding process, particles under 100 nm represented respectively 11.3% and 35.8% of the particles found in the four filters from the cabin and in the four filters from the platform.

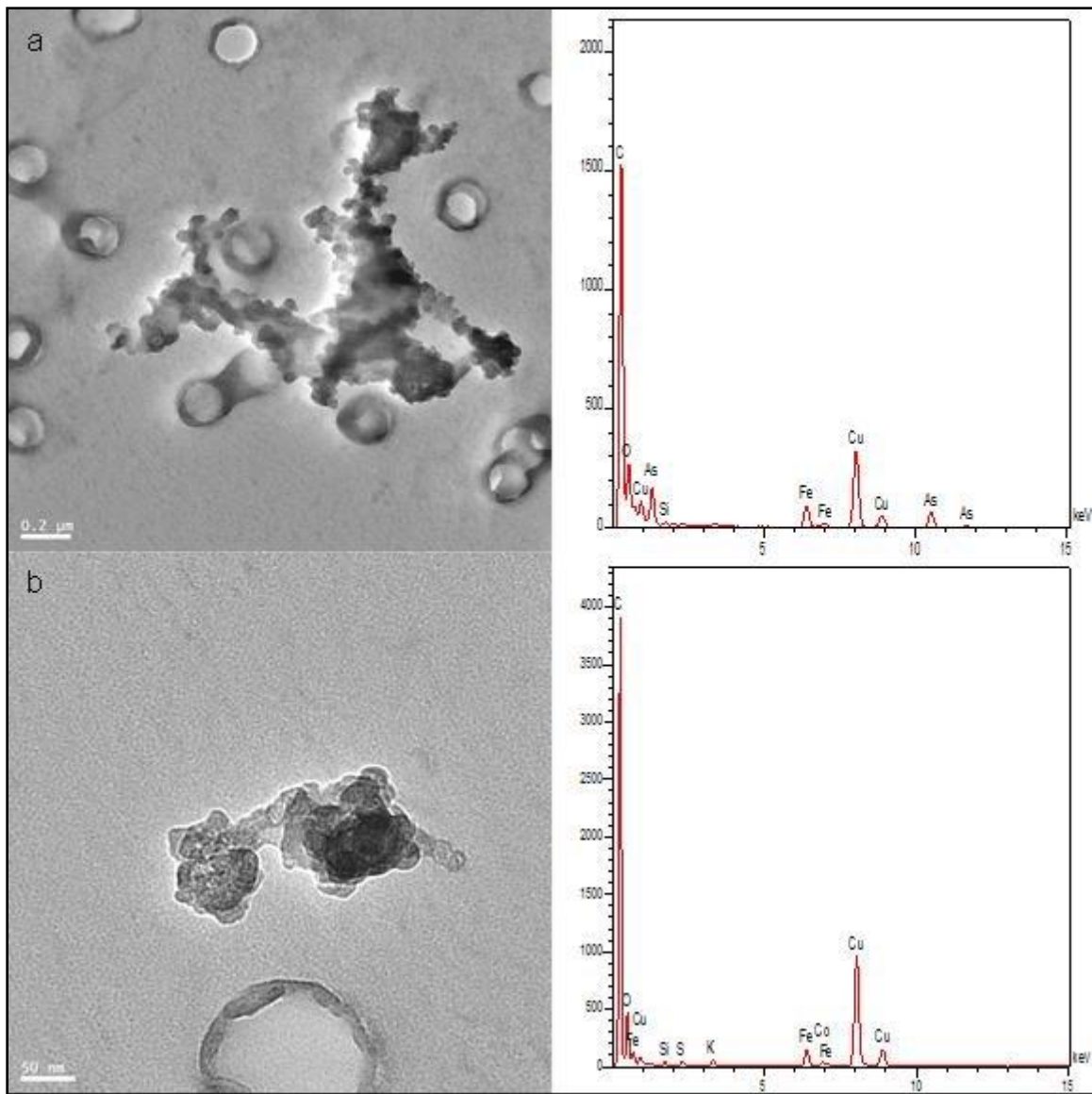


Figure 2: Two examples of transmission electron microscopy (TEM) micrographs of aggregates of carbonaceous particles with associated energy dispersive X-ray analysis spectra (a: x5000, b: x20000)

Rare metallic individual particles of iron and titanium were found on two filters only and were never smaller than 250 nm. To check if metallic nanoparticles were emitted during the grinding process, a sample of scoria was analyzed in SEM. Spherical metallic particles made of iron oxide and manganese were found attached to the scoria with size in a range higher than 100 nm, as shown in figure 3. These particles were not found on the air samples analyzed under TEM.

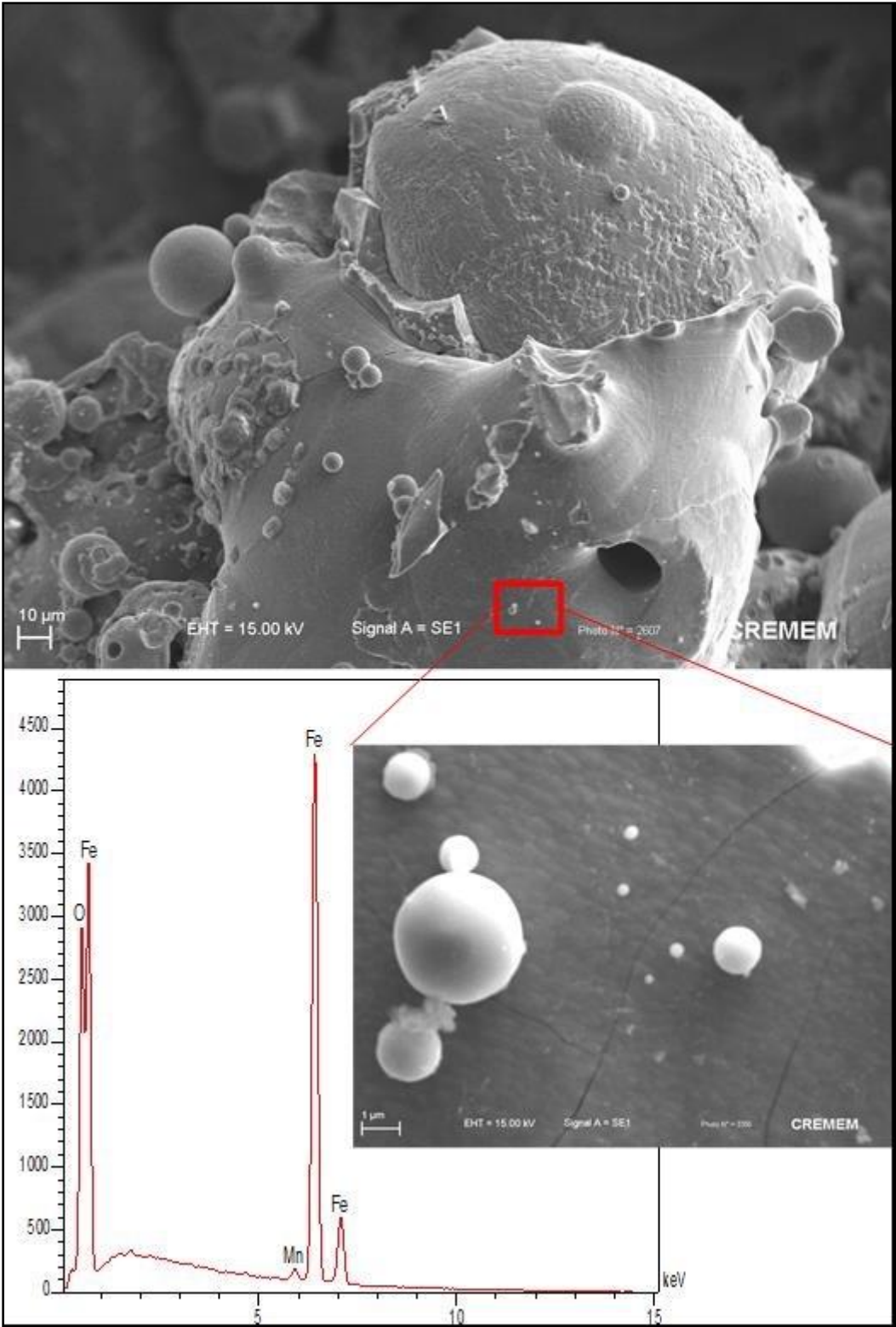


Figure 3: Scanning Electron microscopy (SEM) micrographs of a sample of scoria with associated energy dispersive X-ray analysis spectrum (main micrograph: x 4000, zoom: x20000).

3.3. Characterization of the physical demand based on cardiac frequency

The physical demand analyses for operators working on the subway tracks are summarized in figure 4. Variations of cardiac frequency showed that physical demand reached high levels (heavy and very heavy) and tended to be higher for the metro verifiers. Physical demand was mainly related to moving along the tracks or in the station to follow or get into the train, which represented about half of the total duration of activities. Working postures such as stooping or kneeling representing 20% of total activity duration. Based on observation of the operators' activity, physical demand was increased by wearing the respirators. Peaks of level intensity activities were observed, in generally corresponding to situations when the workers faced technical incidents or had to fight fires.

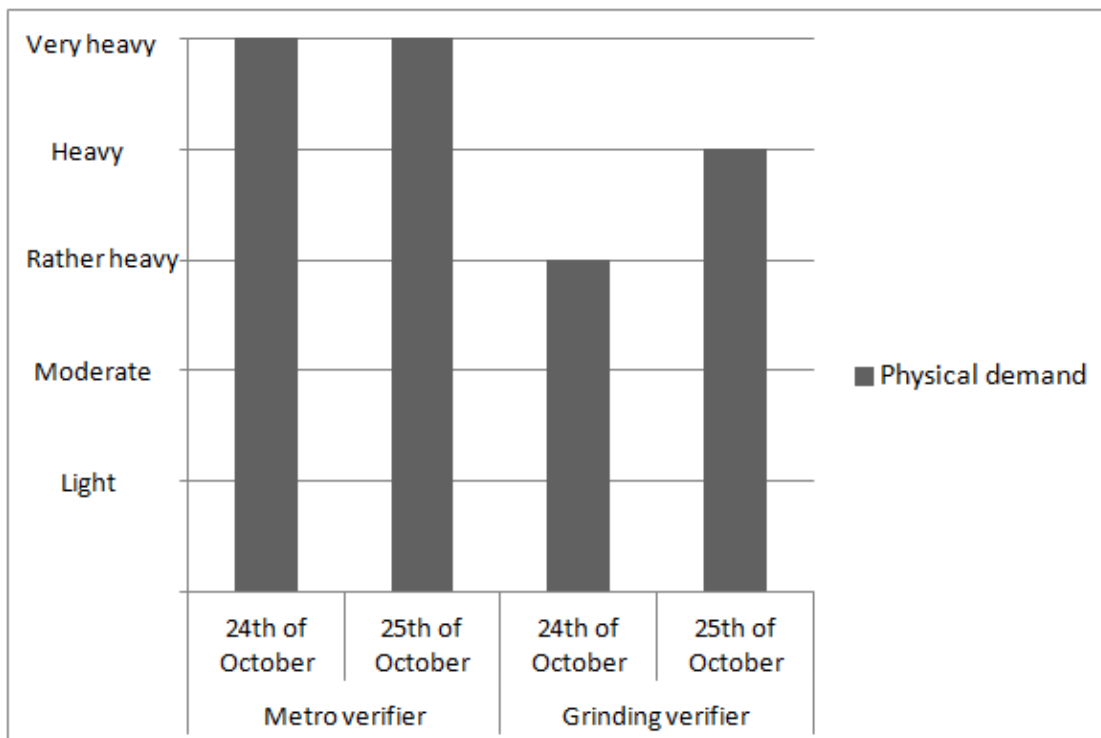


Figure 4: Representation of physical demand based on cardiac frequency for metro and grinding verifiers during track maintenance

4. Discussion

Concentration of PM10 and PM2.5 in subway systems usually exceeds the concentrations observed in ambient or indoor air (ANSES 2015). The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) estimated that PM10 in French

subways is comprised between 0.07 and 0.12 mg/m³ with peaks of 1 mg/m³ during maintenance. These particles are mainly composed of iron and carbon. Iron particles (and other metallic particles such as copper, chromium, nickel, and manganese) may be emitted by the wear of materials caused by friction between wheels and brakes, contact between wheels and rails or contact between the train and the system of power supply. The possible sources of the carbon fractions are braking, the wear of tires, and resuspension of particles emitted by the diesel engines during maintenance. Silica particles may also be found in the roadbed or in the sand used to increase the friction and adhesion in emergency or sloping braking (ANSES 2015).

The background level of inhalable dust in the ambient air of Paris metro stations was found to be variable in preliminary analyses carried out during the two nights of the pilot study in 2009. The concentration of inhalable dust was 0.89 mg/m³ the first night and less than 0.50 mg/m³ the second. Traces of iron (0.08 mg/m³) and nickel (0.03 mg/m³) were found only on the first night. Other metals (aluminum, chromium and lead) were below the limits of detection. As expected, the results of this study carried out during track maintenance, show that grinding activities increased the concentration of inhalable and metal dust in the air, but also of diesel particles, as a diesel engine was used to move the grinding train and to operate the grinding trolleys. Inhalable dust, metallic and gaseous pollutant exposures were all sufficiently well below the OEL for all operators indicating a low health risk. On the contrary, we found that exposure to diesel particles was higher, almost reaching the OEL for the operator working on the track and almost reaching half of the OEL for the drivers. These results are of great concern regarding the possible health effects related to diesel particles in literature; due to their larger reactive surface and association with irritating gaseous exhausts, diesel fumes may induce ocular or respiratory acute irritation with lung function impairment (Morgan, Reger, and Tucker 1997; Rudell et al. 1996; Sydbom et al. 2001; Xu et al. 2013). Chronic respiratory effects such as asthma (Sydbom et al. 2001), chronic pulmonary obstructive disease (Hart et al. 2006) or potentiation of allergens (Ristovski et al. 2012) have also been described. Furthermore, experimental and epidemiological studies have demonstrated that diesel exhaust exposure was a risk factor for coronary heart diseases (Moller et al. 2011). However, probably the most documented and serious effect is the carcinogenicity of diesel particles. Epidemiological studies found that diesel exposures in populations of minors, railway workers or truck drivers were associated with an increased risk of lung cancer (Benbrahim-Tallaa et al. 2012; Wichmann 2007). Experimental studies showed that this carcinogenicity exists for both total diesel exhaust and only particulate fractions

(Benbrahim-Tallaa et al. 2012). Based on these data, the International Agency for Research on Cancer classified diesel exhaust as carcinogenic in June 2012 (IARC 2012). Some data, inconsistent for the moment, indicate that they also might be associated with higher rates of bladder cancer (Boffetta and Silverman 2001; Guo et al. 2004).

These results raised concerns within the Parisian subway company about the need to improve prevention procedures for workers, compatible with rail safety obligations. They justified several modifications on collective protection measures, such as utilization of a particle filter for the auxiliary diesel engine and improvement of the pressurization of the driver's cabin.

The company also decided to invest in a program to replace the diesel working train by an electric train when possible for track maintenance work.

Quantitative analyses on fine and ultrafine particle emission showed several differences in the level of the particle concentrations and its evolution across the two nights. Both peak intensities and mean levels of particles were higher the first night. Although various factors might be implied, topographic differences between the two stations probably explained these differences. The first night of observation was in a simple station and the second in a double station (with two platforms) with a bigger volume of dilution for particles.

Surprisingly, contrary to the initial hypothesis of the occupational physicians, we did not find ultrafine metallic particles in the samples analyzed in TEM. We cannot rule out an artifact during sampling for TEM that could have been improved using size-selective static samplers such as an electrical low pressure impactor (ELPI) or an electrostatic precipitator to collect particles directly onto a TEM grid (Brouwer, Gijssbers, and Lurvink 2004). However, we analyzed grinding scoria and also did not find metallic ultrafine particles. Thus, given the results of personal sampling, we concluded that the peaks of particles observed with the CPC were mainly related to diesel engine emission and not to metallic ultrafine emission during grinding.

Although we found studies dealing with occupational exposure to nanosized particles during handling of nanomaterials (Demou, Peter, and Hellweg 2008; Demou, Stark, and Hellweg 2009; Shepard and Brenner 2014; Curwin and Bertke 2011) or welding activities (Cena et al. 2015; Gomes et al. 2014; Gomes et al. 2012; Cena et al. 2014), we are not aware of any published results describing occupational exposure during rail grinding activities. Our results contrast with publications relating to other grinding activity, in which metallic ultrafine particles were reported to be emitted. Particle emission analyzed in a 1 m³ measure chamber during steel grinding revealed emissions of about 80 000 ultrafine particles/cm³ (Zimmer and

Maynard 2002). Emissions of 12 000 to 20 000 ultrafine particles/cm³ in the workplace air during iron hand grinding activities were also reported (Elihn and Berg 2009).

In our study, the background concentration of particles was between 15 000 and 25 000 particles/cm³, similar to the concentrations found in the Stockholm or London subway systems. In Stockholm, the mean particle number concentration was 12 000 particles/cm³, mainly composed of ultrafine particles. Soot particles from diesel exhaust, and metal-containing particles, primarily iron, were also observed (Midander et al. 2012). In London, similar levels of particle concentration were found, with 67% of the dust mass composed of iron oxide (Seaton et al. 2005). Data from the Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA, Paris, France) indicate that particle concentrations in Paris vary between 15 000 and 40 000 particles/cm³ according to location. For example, in the interior of a car, this concentration was found to reach 65 000 particles/cm³ in the center of Paris and 91 000 particles/cm³ in the greater Parisian area (Le Bihan and Malherbe 2007). Several indoor activities such as cooking, burning candles, using a hair dryer may also produce ultrafine particle emissions. Indeed, particle concentrations have been observed to reach an excess of 200 000/cm³ in indoor air (Ji 2010; Ji et al. 2010).

The characterization of physical demand showed higher than expected intensity levels for the track operators. More than an indicator of the difficulty of the job these results allowed us to interpret the results of the occupational hygiene assessment with an ergotoxicologic approach (Mohammed-Brahim and Garrigou 2009), given that a high level of physical demand induces an increase in cardiac and respiratory frequency and consequently increases cutaneous or respiratory exposure. Moreover, concerning the grinding verifier who had a very high level of physical demand, these data raise concerns about the real efficiency of the protection mask. Indeed, in heavy exercise, respiratory flow rates may exceed those used in tests conditions (Kaufman and Hastings 2005) inducing air leakage with a lower efficiency for filtering masks (He et al. 2014). As such, in situations of high physical demand, such kinds of respirator masks might not be suitable, especially as their efficiency for diesel exhaust particles has not been proven (Penconek, Drazyk, and Moskal 2013). As a consequence, the Parisian subway company made the decision to change the personal respiratory protective equipments from filtering respirators to air-supplied hoods.

5. Conclusion

Set in the Paris metro, our study combined ergonomic analyses of activity, occupational hygiene sampling and characterization of the fine and ultrafine particles emitted in an ergotoxicologic approach. This approach allowed us to demonstrate that the main exposures for workers were related to diesel ultrafine particle emissions and not to the metal exhausts emitted by the grinding. Exposure levels were increased by high physical demand, increasing respiratory exposure. This high physical demand also limited respirator efficiency. Our results improved knowledge on occupational exposure during rail grinding, providing essential data for occupational physicians to assess occupational risks and to provide arguments on the collective and individual preventive measures required. Finally, the didactic aspect of the ergotoxicologic approach implicated all health and security stakeholders including the workers. It raised a discussion of important occupational safety factors and led to the improvement of security and prevention through concrete actions both for the Parisian metro company and subcontracting track maintenance companies.

Supplemental information

Table 1 a, b: Calculation method for physical demand

a	Score	Mean heart frequency (bpm)	Peak heart frequency* (bpm)	Relativ cardiac cost (%)
	5 points	> 120	>150	> 40
	4 points	110 to 119	140 to 149	30 to 39
	3 points	100 to 109	130 to 139	20 to 29
	2 points	90 to 99	120 to 129	10 to 19
	1 point	80 to 89	110 to 119	0 to 9

*defined as heart rate at the 99th percentile

b	Global score	Physical demand
	13 to 15 points	Very heavy
	10 to 12 points	Heavy
	7 to 9 points	Rather heavy
	4 to 6 points	Moderate
	1 to 3 points	Light

Table 2: Sampling characteristics for transmission electron microscopy (TEM) analyses

Sample n°	Day	Time	Location	Sampling duration (sec)
1	24.10.2011	02:55am	Background Cabin	120
2	24.10.2011	02:50am	Background Platform	180
3	24.10.2011	03:47am	Cabin 5 th passage	312
4	24.10.2011	03:45am	Platform 5 th passage	480
5	24.10.2011	04:04am	Cabin 6 th passage	66
6	24.10.2011	04:03am	Platform 6 th passage	93
7	25.10.2011	02:01am	Cabin 2 nd passage	300
8	25.10.2011	02:41am	Platform 2 nd passage	60
9	25.10.2011	03:30am	Cabin 7 th passage	93
10	25.10.2011	03:30am	Platform 7 th passage	60

Acknowledgments

Pippa McKelvie-Sebileau for her careful reading of the manuscript and the English correction. We would like to thank the RATP personnel who were involved in the organization of the study, Mr Bellec Bernard, Mr Monnot Michel, Mr Lespé Bruno, Mr Autin Pascal, Mr Christian Dossard, Mr Testemal Fabien and Mr Pagniez David. We also thank all other workers who participated in the study and the members of the scientific committee: Dr Garnier Robert, Mr Michel Héry, Dr Hubert Catherine and Mr Bruno Dubosc.

References

- Abid, A. D., D. S. Anderson, G. K. Das, L. S. Van Winkle, and I. M. Kennedy. 2013. 'Novel lanthanide-labeled metal oxide nanoparticles improve the measurement of in vivo clearance and translocation', *Part Fibre Toxicol*, 10: 1.
- AFNOR. 1995. "Air des lieux de travail - Échantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques." In. Paris.
- . 1996. "Qualité de l'air - détermination de la concentration en fibres d'amiante par microscopie électronique à transmission." In, edited by Association française de normalisation, 44. Paris.
- . 2002. "Air des lieux de travail - Prélèvement et dosage d'aldéhydes." In. Paris.
- . 2004. "Air des lieux de travail. Prélèvement et analyse de gaz et vapeurs organiques. Prélèvement par pompage sur tube à adsorption et désorption par solvant." In.
- . 2005. "Air des lieux de travail - Détermination des métaux et métalloïdes dans les particules en suspension dans l'air par spectrométrie d'émission atomique avec plasma à couplage inductif." In.
- Agostoni, E., and L. Zocchi. 2007. 'Pleural liquid and its exchanges', *Respir Physiol Neurobiol*, 159: 311-23.
- AIRAQ. 2010. 'Report ET/PE/14/03 : Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en Aquitaine', AIRAQ, Accessed 04.05.2015.
http://www.airaq.asso.fr/fileadmin/user_upload/redacteur/Inventaire_emissions_Aquitaine_2010_V2.0.pdf.
- Ajab, H., A. Yaqub, S. A. Malik, M. Junaid, S. Yasmeen, and M. A. Abdullah. 2014. 'Characterization of toxic metals in tobacco, tobacco smoke, and cigarette ash from selected imported and local brands in Pakistan', *ScientificWorldJournal*, 2014: 413614.
- Al Faraj, A., K. Cieslar, G. Lacroix, S. Gaillard, E. Canet-Soulas, and Y. Cremillieux. 2009. 'In vivo imaging of carbon nanotube biodistribution using magnetic resonance imaging', *Nano Lett*, 9: 1023-7.
- Ali, J., M. Ali, S. Baboota, J. K. Sahani, C. Ramassamy, L. Dao, and Bhavna. 2010. 'Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration', *Curr Pharm Des*, 16: 1644-53.
- Almeida, J. P., A. L. Chen, A. Foster, and R. Drezek. 2011. 'In vivo biodistribution of nanoparticles', *Nanomedicine (Lond)*, 6: 815-35.
- Anderson, P. J., J. D. Wilson, and F. C. Hiller. 1989. 'Particle size distribution of mainstream tobacco and marijuana smoke. Analysis using the electrical aerosol analyzer', *Am Rev Respir Dis*, 140: 202-5.
- Andujar, P., S. Lanone, P. Brochard, and J. Boczkowski. 2011. 'Respiratory effects of manufactured nanoparticles', *Rev Mal Respir*, 28: e66-75.
- ANSES. 2015. "Pollution chimique de l'air des enceintes de transports ferroviaires souterrains et risques sanitaires associés chez les travailleurs." In *Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective*, 361. Paris, France: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Arvizo, R., R. Bhattacharya, and P. Mukherjee. 2010. 'Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine', *Expert Opin Drug Deliv*, 7: 753-63.
- Auerbach, O., A. S. Conston, L. Garfinkel, V. R. Parks, H. D. Kaslow, and E. C. Hammond. 1980. 'Presence of asbestos bodies in organs other than the lung', *Chest*, 77: 133-7.
- Backes, C. H., T. Nelin, M. W. Gorr, and L. E. Wold. 2013. 'Early life exposure to air pollution: how bad is it?', *Toxicol Lett*, 216: 47-53.

- Baek, M., H. E. Chung, J. Yu, J. A. Lee, T. H. Kim, J. M. Oh, W. J. Lee, S. M. Paek, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Choy, and S. J. Choi. 2012. 'Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of zinc oxide nanoparticles', *Int J Nanomedicine*, 7: 3081-97.
- Bakand, S., A. Hayes, and F. Dechsakulthorn. 2012. 'Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure', *Inhal Toxicol*, 24: 125-35.
- Baker, R. R., and M. Dixon. 2006. 'The retention of tobacco smoke constituents in the human respiratory tract', *Inhal Toxicol*, 18: 255-94.
- Balansky, R., M. Longobardi, G. Ganchev, M. Iltcheva, N. Nedyalkov, P. Atanasov, R. Toshkova, S. De Flora, and A. Izzotti. 2013. 'Transplacental clastogenic and epigenetic effects of gold nanoparticles in mice', *Mutat Res*, 751-752: 42-8.
- Balasubramanian, S. K., J. Jittiwat, J. Manikandan, C. N. Ong, L. E. Yu, and W. Y. Ong. 2010. 'Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats', *Biomaterials*, 31: 2034-42.
- Barton, H. A., V. J. Cogliano, L. Flowers, L. Valcovic, R. W. Setzer, and T. J. Woodruff. 2005. 'Assessing susceptibility from early-life exposure to carcinogens', *Environ Health Perspect*, 113: 1125-33.
- Benbrahim-Tallaa, L., R. A. Baan, Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, N. Guha, D. Loomis, K. Straif, and Group International Agency for Research on Cancer Monograph Working. 2012. 'Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes', *Lancet Oncol*, 13: 663-4.
- Bernaudin, J. F., and J. Fleury-Feith. 2006. '[Structure and physiology of the pleura and the pleural space]', *Rev Pneumol Clin*, 62: 73-7.
- Bernhard, D., A. Rossmann, and G. Wick. 2005. 'Metals in cigarette smoke', *IUBMB Life*, 57: 805-9.
- Bernstein, D. M., K. Donaldson, U. Decker, S. Gaering, P. Kunzendorf, J. Chevalier, and S. E. Holm. 2008. 'A biopersistence study following exposure to chrysotile asbestos alone or in combination with fine particles', *Inhal Toxicol*, 20: 1009-28.
- Bernstein, D. M., R. A. Rogers, R. Sepulveda, K. Donaldson, D. Schuler, S. Gaering, P. Kunzendorf, J. Chevalier, and S. E. Holm. 2011. 'Quantification of the pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite-asbestos following short-term inhalation exposure', *Inhal Toxicol*, 23: 372-91.
- Blum, J. L., J. Q. Xiong, C. Hoffman, and J. T. Zelikoff. 2012. 'Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth', *Toxicol Sci*, 126: 478-86.
- Bodenhofer, U., and F. Klawonn. 2008. 'Robust rank correlation coefficients on the basis of fuzzy orderings: Initial steps', *Mathware & Soft Computing*, 15: 5-20.
- Bodenhofer, U., and M. Krone. 2013. 'RoCoCo: An R package implementing a robust rank correlation coefficient and a corresponding test', Institute of Bioinformatics, Johannes Kepler University <http://cran.r-project.org/web/packages/rococo/vignettes/rococo.pdf>.
- Boffetta, P., and D. T. Silverman. 2001. 'A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure', *Epidemiology*, 12: 125-30.
- Bonner, J. C. 2010. 'Nanoparticles as a potential cause of pleural and interstitial lung disease', *Proc Am Thorac Soc*, 7: 138-41.
- Boutin, C., P. Dumortier, F. Rey, J. R. Viallat, and P. De Vuyst. 1996. 'Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study', *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 444-9.
- Boyes, W. K., R. Chen, C. Chen, and R. A. Yokel. 2012. 'The neurotoxic potential of engineered nanomaterials', *Neurotoxicology*, 33: 902-10.

- Brauer, M., C. Avila-Casado, T. I. Fortoul, S. Vedal, B. Stevens, and A. Churg. 2001. 'Air pollution and retained particles in the lung', *Environ Health Perspect*, 109: 1039-43.
- Brinkman, M. C., J. C. Chuang, S. M. Gordon, H. Kim, R. R. Kroeger, G. M. Polzin, and P. A. Richter. 2012. 'Exposure to and deposition of fine and ultrafine particles in smokers of menthol and nonmenthol cigarettes', *Inhal Toxicol*, 24: 255-69.
- Broadus, V. C., J. I. Everitt, B. Black, and A. B. Kane. 2011. 'Non-neoplastic and neoplastic pleural endpoints following fiber exposure', *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 14: 153-78.
- Broday, DM, and R. Rosenzweig. 2011. 'Deposition of fractal-like soot aggregates in the human respiratory tract', *Journal of Aerosol Science*, 42: 372-86.
- Brouwer, D. H., J. H. Gijssbers, and M. W. Lurvink. 2004. 'Personal exposure to ultrafine particles in the workplace: exploring sampling techniques and strategies', *Ann Occup Hyg*, 48: 439-53.
- Brown, J. S., W. E. Wilson, and L. D. Grant. 2005. 'Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans', *Inhal Toxicol*, 17: 355-85.
- Brown, J. S., K. L. Zeman, and W. D. Bennett. 2002. 'Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung', *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1240-7.
- Brunner, T. J., P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink, and W. J. Stark. 2006. 'In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility', *Environ Sci Technol*, 40: 4374-81.
- Buerki-Thurnherr, T., U. von Mandach, and P. Wick. 2012. 'Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier', *Swiss Med Wkly*, 142: w13559.
- Bunn, H. J., D. Dinsdale, T. Smith, and J. Grigg. 2001. 'Ultrafine particles in alveolar macrophages from normal children', *Thorax*, 56: 932-4.
- Burns, A. A., J. Vider, H. Ow, E. Herz, O. Penate-Medina, M. Baumgart, S. M. Larson, U. Wiesner, and M. Bradbury. 2009. 'Fluorescent silica nanoparticles with efficient urinary excretion for nanomedicine', *Nano Lett*, 9: 442-8.
- Campagnolo, L., M. Massimiani, G. Palmieri, R. Bernardini, C. Sacchetti, A. Bergamaschi, L. Vecchione, A. Magrini, M. Bottini, and A. Pietroiusti. 2013. 'Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice', *Part Fibre Toxicol*, 10: 21.
- Card, J. W., D. C. Zeldin, J. C. Bonner, and E. R. Nestmann. 2008. 'Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295: L400-11.
- Carvalho, T. C., J. I. Peters, and R. O. Williams, 3rd. 2011. 'Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there?', *Int J Pharm*, 406: 1-10.
- Cena, L. G., W. P. Chisholm, M. J. Keane, and B. T. Chen. 2015. 'A Field Study on the Respiratory Deposition of the Nano-Sized Fraction of Mild and Stainless Steel Welding Fume Metals', *J Occup Environ Hyg*, 12: 721-8.
- Cena, L. G., M. J. Keane, W. P. Chisholm, S. Stone, M. Harper, and B. T. Chen. 2014. 'A novel method for assessing respiratory deposition of welding fume nanoparticles', *J Occup Environ Hyg*, 11: 771-80.
- Cho, W. S., B. C. Kang, J. K. Lee, J. Jeong, J. H. Che, and S. H. Seok. 2013. 'Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration', *Part Fibre Toxicol*, 10: 9.
- Choi, H. S., Y. Ashitate, J. H. Lee, S. H. Kim, A. Matsui, N. Insin, M. G. Bawendi, M. Semmler-Behnke, J. V. Frangioni, and A. Tsuda. 2010. 'Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body', *Nat Biotechnol*, 28: 1300-3.

- Choi, H. S., W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi, and J. V. Frangioni. 2007. 'Renal clearance of quantum dots', *Nat Biotechnol*, 25: 1165-70.
- Chu, M., Q. Wu, H. Yang, R. Yuan, S. Hou, Y. Yang, Y. Zou, S. Xu, K. Xu, A. Ji, and L. Sheng. 2010. 'Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier', *Small*, 6: 670-8.
- Churg, A., and M. Brauer. 1997. 'Human lung parenchyma retains PM2.5', *Am J Respir Crit Care Med*, 155: 2109-11.
- . 2000. 'Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs', *Ultrastruct Pathol*, 24: 353-61.
- Creutzenberg, O., B. Bellmann, R. Korolewitz, W. Koch, I. Mangelsdorf, T. Tillmann, and D. Schaudien. 2012. 'Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles in vivo following lung exposure in rats', *Inhal Toxicol*, 24: 821-30.
- Cui, Y., X. Chen, Z. Zhou, Y. Lei, M. Ma, R. Cao, T. Sun, J. Xu, M. Huo, R. Cao, C. Wen, and Y. Che. 2014. 'Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats', *Chemosphere*, 96: 99-104.
- Curwin, B., and S. Bertke. 2011. 'Exposure characterization of metal oxide nanoparticles in the workplace', *J Occup Environ Hyg*, 8: 580-7.
- Daher, N., R. Saleh, E. Jaroudi, H. Sheheitli, T. Badr, E. Sepetdjian, M. Al Rashidi, N. Saliba, and A. Shihadeh. 2010. 'Comparison of carcinogen, carbon monoxide, and ultrafine particle emissions from narghile waterpipe and cigarette smoking: Sidestream smoke measurements and assessment of second-hand smoke emission factors', *Atmos Environ (1994)*, 44: 8-14.
- De Jong, W. H., W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. Sips, and R. E. Geertsma. 2008. 'Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration', *Biomaterials*, 29: 1912-9.
- De Vuyst, P. 1997. '[Physiopathology of pleural diseases]', *Rev Prat*, 47: 1294-7.
- Decologne, N., G. Wettstein, M. Kolb, P. Margetts, C. Garrido, P. Camus, and P. Bonniaud. 2010. 'Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles', *Eur Respir J*, 35: 176-85.
- Deering, C. E., S. Tadjiki, S. Assemi, J. D. Miller, G. S. Yost, and J. M. Veranth. 2008. 'A novel method to detect unlabeled inorganic nanoparticles and submicron particles in tissue by sedimentation field-flow fractionation', *Part Fibre Toxicol*, 5: 18.
- Delcourt, J., and JP Sandino. 2000. 'Evaluation des performances du badge GABIE® dans des atmosphères industrielles. Etude de cas', *Hygiène et sécurité du travail*, 181: 12.
- Demou, E., P. Peter, and S. Hellweg. 2008. 'Exposure to manufactured nanostructured particles in an industrial pilot plant', *Ann Occup Hyg*, 52: 695-706.
- Demou, E., W. J. Stark, and S. Hellweg. 2009. 'Particle emission and exposure during nanoparticle synthesis in research laboratories', *Ann Occup Hyg*, 53: 829-38.
- Deng, X, G Jia, H Wang, H Sun, X Wang, S Yang, T Wang, and Y Liu. 2007. 'Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo', *Carbon*, 45.
- Di Bona, K. R., Y. Xu, P. A. Ramirez, J. DeLaine, C. Parker, Y. Bao, and J. F. Rasco. 2014. 'Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice', *Reprod Toxicol*, 50: 36-42.
- Dikensoy, O., and H. Bayram. 2010. 'The current data on nanoparticles and pleura', *Tuberk Toraks*, 58: 455-8.
- Dodson, R. F., and M. A. Atkinson. 2006. 'Measurements of asbestos burden in tissues', *Ann N Y Acad Sci*, 1076: 281-91.

- Donaldson, K., G Oberdörster, G Ichihara, AD Maynard, F Marano, H Wallin, C Lang Tran, V Stone, S Hermann, S Loft, and PJA Borm. 2009. 'Nanoparticles - one word: A multiplicity of different hazards.', *Nanotoxicology*, 3: 263-64.
- Donaldson, K., F. A. Murphy, R. Duffin, and C. A. Poland. 2010. 'Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma', *Part Fibre Toxicol*, 7: 5.
- Donaldson, K., C. A. Poland, F. A. Murphy, M. MacFarlane, T. Chernova, and A. Schinwald. 2013. 'Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences', *Adv Drug Deliv Rev*, 65: 2078-86.
- Donaldson, K., L. Tran, L. A. Jimenez, R. Duffin, D. E. Newby, N. Mills, W. MacNee, and V. Stone. 2005. 'Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure', *Part Fibre Toxicol*, 2: 10.
- Dumortier, P., F. Rey, J. R. Viallat, I. Broucke, C. Boutin, and P. De Vuyst. 2002. 'Chrysotile and tremolite asbestos fibres in the lungs and parietal pleura of Corsican goats', *Occup Environ Med*, 59: 643-6.
- Dziendzikowska, K., J. Gromadzka-Ostrowska, A. Lankoff, M. Oczkowski, A. Krawczynska, J. Chwastowska, M. Sadowska-Bratek, E. Chajduk, M. Wojewodzka, M. Dusinska, and M. Kruszewski. 2012. 'Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats', *J Appl Toxicol*, 32: 920-8.
- Egashira, R., T. Tanaka, T. Imaizumi, K. Senda, Y. Doki, S. Kudo, and J. Fukuoka. 2013. 'Differential distribution of lymphatic clearance between upper and lower regions of the lung', *Respirology*, 18: 348-53.
- El-Sayed, Y. S., R. Shimizu, A. Onoda, K. Takeda, and M. Umezawa. 2015. 'Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice', *Toxicology*, 327: 53-61.
- Elder, A., R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, L. Opanashuk, J. Carter, R. Potter, A. Maynard, Y. Ito, J. Finkelstein, and G. Oberdorster. 2006. 'Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system', *Environ Health Perspect*, 114: 1172-8.
- Elihn, K., and P. Berg. 2009. 'Ultrafine particle characteristics in seven industrial plants', *Ann Occup Hyg*, 53: 475-84.
- Ema, M., N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, and J. Nakanishi. 2010. 'Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials', *Reprod Toxicol*, 30: 343-52.
- Ema, M., M. Naya, M. Horimoto, and H. Kato. 2013. 'Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals', *Reprod Toxicol*, 42: 1-17.
- EU. 2011. "Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance." In, edited by European Commission. Brussels.
- Eydner, M., D. Schaudien, O. Creutzenberg, H. Ernst, T. Hansen, W. Baumgartner, and S. Rittinghausen. 2012. 'Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index', *Inhal Toxicol*, 24: 557-69.
- Ferin, J., G. Oberdorster, and D. P. Penney. 1992. 'Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6: 535-42.
- Fleury Feith, J., and M. C. Jaurand. 2013. '[Pleural lymphatics and pleural diseases related to fibres]', *Rev Pneumol Clin*, 69: 358-62.

- Florence, A. T., A. M. Hillery, N. Hussain, and P. U. Jani. 1995. 'Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence', *J Drug Target*, 3: 65-70.
- Frohlich, E., and E. Roblegg. 2012. 'Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products', *Toxicology*, 291: 10-7.
- Furuyama, A., S. Kanno, T. Kobayashi, and S. Hirano. 2009. 'Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes', *Arch Toxicol*, 83: 429-37.
- Garnett, M. C., and P. Kallinteri. 2006. 'Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles', *Occup Med (Lond)*, 56: 307-11.
- Gatti, A. M., P. Bosco, F. Rivasi, S. Bianca, G. Ettore, L. Gaetti, S. Montanari, G. Bartoloni, and D. Gazzolo. 2011. 'Heavy metals nanoparticles in fetal kidney and liver tissues', *Front Biosci (Elite Ed)*, 3: 221-6.
- Gatti, A. M., S. Montanari, E. Monari, A. Gambarelli, F. Capitani, and B. Parisini. 2004. 'Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood', *J Mater Sci Mater Med*, 15: 469-72.
- Geiser, M., and W. G. Kreyling. 2010. 'Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles', *Part Fibre Toxicol*, 7: 2.
- Geraets, L., A. G. Oomen, J. D. Schroeter, V. A. Coleman, and F. R. Cassee. 2012. 'Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study', *Toxicol Sci*, 127: 463-73.
- Ghaderi, S., S. R. Tabatabaei, H. N. Varzi, and M. Rashno. 2015. 'Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice', *J Toxicol Sci*, 40: 263-75.
- Glista-Baker, E. E., A. J. Taylor, B. C. Sayers, E. A. Thompson, and J. C. Bonner. 2012. 'Nickel nanoparticles enhance platelet-derived growth factor-induced chemokine expression by mesothelial cells via prolonged mitogen-activated protein kinase activation', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47: 552-61.
- Gomes, J. F., P. C. Albuquerque, R. M. Miranda, and M. T. Vieira. 2012. 'Determination of airborne nanoparticles from welding operations', *J Toxicol Environ Health A*, 75: 747-55.
- Gomes, J. F., R. M. Miranda, T. J. Santos, and P. A. Carvalho. 2014. 'Emission of nanoparticles during friction stir welding (FSW) of aluminium alloys', *J Toxicol Environ Health A*, 77: 924-30.
- Grafmueller, S., P. Manser, L. Diener, P. A. Diener, X. Maeder-Althaus, L. Maurizi, W. Jochum, H. F. Krug, T. Buerki-Thurnherr, U. von Mandach, and P. Wick. 2015. 'Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an Human Placental Perfusion Model', *Environ Health Perspect*.
- Grafmuller, S., P. Manser, H. F. Krug, P. Wick, and U. von Mandach. 2013. 'Determination of the transport rate of xenobiotics and nanomaterials across the placenta using the ex vivo human placental perfusion model', *J Vis Exp*.
- Gray, E. P., J. G. Coleman, A. J. Bednar, A. J. Kennedy, J. F. Ranville, and C. P. Higgins. 2013. 'Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry', *Environ Sci Technol*, 47: 14315-23.
- Gu, J., U. Kraus, A. Schneider, R. Hampel, M. Pitz, S. Breitner, K. Wolf, O. Hanninen, A. Peters, and J. Cyrus. 2015. 'Personal day-time exposure to ultrafine particles in different microenvironments', *Int J Hyg Environ Health*, 218: 188-95.
- Guo, J., T. Kauppinen, P. Kyyronen, P. Heikkila, M. L. Lindbohm, and E. Pukkala. 2004. 'Risk of esophageal, ovarian, testicular, kidney and bladder cancers and leukemia

- among finnish workers exposed to diesel or gasoline engine exhaust', *Int J Cancer*, 111: 286-92.
- Hagens, W. I., A. G. Oomen, W. H. de Jong, F. R. Cassee, and A. J. Sips. 2007. 'What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?', *Regul Toxicol Pharmacol*, 49: 217-29.
- Haque, A. K., D. M. Vrazel, and T. Uchida. 1998. 'Assessment of asbestos burden in the placenta and tissue digests of stillborn infants in South Texas', *Arch Environ Contam Toxicol*, 35: 532-8.
- Hart, J. E., F. Laden, M. B. Schenker, and E. Garshick. 2006. 'Chronic obstructive pulmonary disease mortality in diesel-exposed railroad workers', *Environ Health Perspect*, 114: 1013-7.
- Hauser, R., J. J. Godleski, V. Hatch, and D. C. Christiani. 2001. 'Ultrafine particles in human lung macrophages', *Arch Environ Health*, 56: 150-6.
- He, X., T. Reponen, R. McKay, and S. A. Grinshpun. 2014. 'How does breathing frequency affect the performance of an N95 filtering facepiece respirator and a surgical mask against surrogates of viral particles?', *J Occup Environ Hyg*, 11: 178-85.
- He, X., H. Zhang, Y. Ma, W. Bai, Z. Zhang, K. Lu, Y. Ding, Y. Zhao, and Z. Chai. 2010. 'Lung deposition and extrapulmonary translocation of nano-ceria after intratracheal instillation', *Nanotechnology*, 21: 285103.
- HEI. 2013. "HEI Review Panel on Ultrafine Particles." In *Understanding the Health Effects of Ambient Ultrafine Particles*. , 122. Boston, MA: Health Effects Institute.
- Hiller, F. C., P. J. Anderson, and M. K. Mazumder. 1987. 'Deposition of sidestream cigarette smoke in the human respiratory tract. II. Deposition of ultrafine smoke particles', *Toxicol Lett*, 35: 95-9.
- Hillyer, J. F., and R. M. Albrecht. 2001. 'Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles', *J Pharm Sci*, 90: 1927-36.
- Hirst, S. M., A. Karakoti, S. Singh, W. Self, R. Tyler, S. Seal, and C. M. Reilly. 2013. 'Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice', *Environ Toxicol*, 28: 107-18.
- Holt, P. F. 1981. 'Transport of inhaled dust to extrapulmonary sites', *J Pathol*, 133: 123-9.
- Hong, J. S., M. K. Park, M. S. Kim, J. H. Lim, G. J. Park, E. H. Maeng, J. H. Shin, M. K. Kim, J. Jeong, J. A. Park, J. C. Kim, and H. C. Shin. 2014. 'Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats', *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 2: 159-71.
- Hougaard, K. S., L. Campagnolo, P. Chavatte-Palmer, A. Tarrade, D. Rousseau-Ralliard, S. Valentino, M. V. Park, W. H. de Jong, G. Wolterink, A. H. Piersma, B. L. Ross, G. R. Hutchison, J. S. Hansen, U. Vogel, P. Jackson, R. Slama, A. Pietroiusti, and F. R. Cassee. 2015. 'A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles', *Reprod Toxicol*, 56: 118-40.
- Hougaard, KS, B Fadeel, M Gulumian, VE Kagan, and K Savolainen. 2011. 'Developmental toxicity of engineered nanoparticles.' in RC Gupta (ed.), *Reproductive and developmental toxicology* (Academic Press: Amsterdam).
- Hull, M. J., and J. L. Abraham. 2002. 'Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis', *Hum Pathol*, 33: 819-25.
- Hunt, A., J. L. Abraham, B. Judson, and C. L. Berry. 2003. 'Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues', *Environ Health Perspect*, 111: 1209-14.
- Hussain, S., J. A. Vanoirbeek, S. Haenen, V. Haufroid, S. Boland, F. Marano, B. Nemery, and P. H. Hoet. 2013. 'Prior lung inflammation impacts on body distribution of gold nanoparticles', *Biomed Res Int*, 2013: 923475.

- IARC. 2012. "Diesel engine exhaust carcinogenic." In.
- INRS. 2007. 'Particules émises par des moteurs diesel', INRS édition, Accessed April the 9th. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/\\$File/038.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/A0182E48EA5A4927C1256D5C0041FA84/$File/038.pdf).
- . 2012. *Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France* (Edition INRS: Paris).
- . 2013. 'Amiante par microscopie électronique à transmission, Fiche Metropol 010V02.02', INRS. [http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/D8D01F81566F2A39C1256D5C0041E58A/\\$File/010.pdf](http://www.inrs.fr/inrs-pub/inrs01.Nsf/D8D01F81566F2A39C1256D5C0041E58A/$File/010.pdf)
- Ishimatsu, S., T. Oyabu, H. Hori, and I. Tanaka. 1999. 'A new digestion method for recovery of MMMFs from lungs', *Ind Health*, 37: 307-12.
- ISO. 2007. "Workplace atmospheres Ultrafine. nanoparticle and nano-structured aerosols. Inhalation exposure characterization and assessment." In *ISO/TR 27628:2007*, edited by International Organization for Standardization, 28. Geneva.
- Jackson, P., K. S. Hougaard, A. M. Boisen, N. R. Jacobsen, K. A. Jensen, P. Moller, G. Brunborg, K. B. Gutzkow, O. Andersen, S. Loft, U. Vogel, and H. Wallin. 2012. 'Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring', *Nanotoxicology*, 6: 486-500.
- Jackson, P., U. Vogel, H. Wallin, and K. S. Hougaard. 2011. 'Prenatal exposure to carbon black (printex 90): effects on sexual development and neurofunction', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 109: 434-7.
- Jani, P., G. W. Halbert, J. Langridge, and A. T. Florence. 1990. 'Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency', *J Pharm Pharmacol*, 42: 821-6.
- Ji, X. 2010. 'Évaluation des expositions humaines aux particules ultrafines', Université Paris-Est École doctorale ABIÉS.
- Ji, X., O. Le Bihan, O. Ramalho, C. Mandin, B. D'Anna, L. Martinon, M. Nicolas, D. Bard, and J. C. Pairon. 2010. 'Characterization of particles emitted by incense burning in an experimental house', *Indoor Air*, 20: 147-58.
- Jo, E., G. Seo, J. T. Kwon, M. Lee, Bc Lee, I. Eom, P. Kim, and K. Choi. 2013. 'Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats', *J Toxicol Sci*, 38: 525-30.
- Juch, H., L. Nikitina, P. Debbage, G. Dohr, and M. Gauster. 2013. 'Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues', *Reprod Toxicol*, 41: 73-9.
- Kalappanavar, N. K., C. S. Vinodkumar, C. Gouli, D. Sanjay, K. Nagendra, K. G. Basavarajappa, and R. Patil. 2012. 'Carbon particles in airway macrophage as a surrogate marker in the early detection of lung diseases', *Int J Occup Environ Med*, 3: 68-75.
- Kane, A. B. 2006. 'Animal models of malignant mesothelioma', *Inhal Toxicol*, 18: 1001-4.
- Kannan, S., D. P. Misra, J. T. Dvonch, and A. Krishnakumar. 2006. 'Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition', *Environ Health Perspect*, 114: 1636-42.
- Kao, Y. Y., T. J. Cheng, D. M. Yang, C. T. Wang, Y. M. Chiung, and P. S. Liu. 2012. 'Demonstration of an olfactory bulb-brain translocation pathway for ZnO nanoparticles in rodent cells in vitro and in vivo', *J Mol Neurosci*, 48: 464-71.
- Kaufman, J., and S. Hastings. 2005. 'Respiratory demand during rigorous physical work in a chemical protective ensemble', *J Occup Environ Hyg*, 2: 98-110.

- Kendall, M., and S. Holgate. 2012. 'Health impact and toxicological effects of nanomaterials in the lung', *Respirology*, 17: 743-58.
- Kettiger, H., A. Schipanski, P. Wick, and J. Huwyler. 2013. 'Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism', *Int J Nanomedicine*, 8: 3255-69.
- Khlebtsov, N., and L. Dykman. 2011. 'Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies', *Chem Soc Rev*, 40: 1647-71.
- Kirby, P. J., C. J. Shines, G. J. Taylor, R. W. Bousquet, H. C. Price, J. I. Everitt, and D. L. Morgan. 2009. 'Pleural effects of indium phosphide in B6C3F1 mice: nonfibrous particulate induced pleural fibrosis', *Exp Lung Res*, 35: 858-82.
- Kong, L., M. Tang, T. Zhang, D. Wang, K. Hu, W. Lu, C. Wei, G. Liang, and Y. Pu. 2014. 'Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats', *Int J Mol Sci*, 15: 21253-69.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, and W. Moller. 2006. 'Ultrafine particle-lung interactions: does size matter?', *J Aerosol Med*, 19: 74-83.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, J. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, and G. Oberdorster. 2009. 'Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs', *Inhal Toxicol*, 21 Suppl 1: 55-60.
- Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, S. Takenaka, and W. Moller. 2013. 'Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles', *Acc Chem Res*, 46: 714-22.
- Kreyling, W. G., M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdorster, and A. Ziesenis. 2002. 'Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low', *J Toxicol Environ Health A*, 65: 1513-30.
- Kulkarni, N., N. Pierse, L. Rushton, and J. Grigg. 2006. 'Carbon in airway macrophages and lung function in children', *N Engl J Med*, 355: 21-30.
- Kulvietis, V., V. Zalgevicene, J. Didziapetriene, and R. Rotomskis. 2011. 'Transport of nanoparticles through the placental barrier', *Tohoku J Exp Med*, 225: 225-34.
- Kumar, P., L. Morawska, W. Birmili, P. Paasonen, M. Hu, M. Kulmala, R. M. Harrison, L. Norford, and R. Britter. 2014. 'Ultrafine particles in cities', *Environ Int*, 66: 1-10.
- Kunzmann, A., B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, and B. Fadeel. 2011. 'Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation', *Biochim Biophys Acta*, 1810: 361-73.
- Kwon, J. T., S. K. Hwang, H. Jin, D. S. Kim, A. Minai-Tehrani, H. J. Yoon, M. Choi, T. J. Yoon, D. Y. Han, Y. W. Kang, B. I. Yoon, J. K. Lee, and M. H. Cho. 2008. 'Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice', *J Occup Health*, 50: 1-6.
- Laborda, F., E. Bolea, and J. Jimenez-Lamana. 2014. 'Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis', *Anal Chem*, 86: 2270-8.
- Landsiedel, R., E. Fabian, L. Ma-Hock, B. van Ravenzwaay, W. Wohlleben, K. Wiench, and F. Oesch. 2012. 'Toxico-/biokinetics of nanomaterials', *Arch Toxicol*, 86: 1021-60.
- Le Bihan, O, and L Malherbe. 2007. "Connaissance de la pollution par les particules submicroniques." In *Métrologie des particules*, 67. INERIS.
- Leak, L. V. 1980. 'Lymphatic removal of fluids and particles in the mammalian lung', *Environ Health Perspect*, 35: 55-75.
- Lee, Y., J. Choi, P. Kim, K. Choi, S. Kim, W. Shon, and K. Park. 2012. 'A transfer of silver nanoparticles from pregnant rat to offspring', *Toxicol Res*, 28: 139-41.

- LeFevre, M. E., F. H. Green, D. D. Joel, and W. Laqueur. 1982. 'Frequency of black pigment in livers and spleens of coal workers: correlation with pulmonary pathology and occupational information', *Hum Pathol*, 13: 1121-6.
- Levy, L., I. S. Chaudhuri, N. Krueger, and R. J. McCunney. 2012. 'Does carbon black disaggregate in lung fluid? A critical assessment', *Chem Res Toxicol*, 25: 2001-6.
- Li, C. H., C. C. Shen, Y. W. Cheng, S. H. Huang, C. C. Wu, C. C. Kao, J. W. Liao, and J. J. Kang. 2012. 'Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice', *Nanotoxicology*, 6: 746-56.
- Li, C., X. Li, A. K. Suzuki, Y. Zhang, Y. Fujitani, K. Nagaoka, G. Watanabe, and K. Taya. 2013. 'Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats', *J Reprod Dev*, 59: 145-50.
- Li, S. D., and L. Huang. 2008. 'Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles', *Mol Pharm*, 5: 496-504.
- Lipka, J., M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W. J. Parak, and W. G. Kreyling. 2010. 'Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection', *Biomaterials*, 31: 6574-81.
- Liu, Y., Y. Gao, L. Zhang, T. Wang, J. Wang, F. Jiao, W. Li, Y. Liu, Y. Li, B. Li, Z. Chai, G. Wu, and C. Chen. 2009. 'Potential health impact on mice after nasal instillation of nano-sized copper particles and their translocation in mice', *J Nanosci Nanotechnol*, 9: 6335-43.
- Liu, Y., Y. C. Tseng, and L. Huang. 2012. 'Biodistribution studies of nanoparticles using fluorescence imaging: a qualitative or quantitative method?', *Pharm Res*, 29: 3273-7.
- Loeschner, K., N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. R. Lam, and E. H. Larsen. 2011. 'Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate', *Part Fibre Toxicol*, 8: 18.
- Lozano, O., J. Laloy, L. Alpan, J. Mejia, S. Rolin, O. Toussaint, J. M. Dogne, S. Lucas, and B. Masereel. 2012. 'Effects of SiC nanoparticles orally administered in a rat model: biodistribution, toxicity and elemental composition changes in feces and organs', *Toxicol Appl Pharmacol*, 264: 232-45.
- Malfatti, M. A., H. A. Palko, E. A. Kuhn, and K. W. Turteltaub. 2012. 'Determining the pharmacokinetics and long-term biodistribution of SiO₂ nanoparticles in vivo using accelerator mass spectrometry', *Nano Lett*, 12: 5532-8.
- Mathiesen, L., T. A. Morck, G. Zuri, M. H. Andersen, C. Pehrson, M. Frederiksen, T. Mose, E. Rytting, M. S. Poulsen, J. K. Nielsen, and L. E. Knudsen. 2014. 'Modelling of human transplacental transport as performed in Copenhagen, Denmark', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 115: 93-100.
- Melnik, E. A., Y. P. Buzulukov, V. F. Demin, V. A. Demin, I. V. Gmoshinski, N. V. Tyshko, and V. A. Tutelyan. 2013. 'Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats', *Acta Naturae*, 5: 107-15.
- Menezes, V., A. Malek, and J. A. Keelan. 2011. 'Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure', *Curr Pharm Biotechnol*, 12: 731-42.
- Mercer, R. R., A. F. Hubbs, J. F. Scabilloni, L. Wang, L. A. Battelli, D. Schwegler-Berry, V. Castranova, and D. W. Porter. 2010. 'Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes', *Part Fibre Toxicol*, 7: 28.
- Mercer, R. R., J. F. Scabilloni, A. F. Hubbs, L. Wang, L. A. Battelli, W. McKinney, V. Castranova, and D. W. Porter. 2013. 'Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure', *Part Fibre Toxicol*, 10: 38.

- Methner, M., L. Hodson, A. Dames, and C. Geraci. 2010. 'Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials--Part B: Results from 12 field studies', *J Occup Environ Hyg*, 7: 163-76.
- Meunier, P. 1997. 'Protocole pratique de mesurage et d'analyse cardiofréquencemétrique', *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)*, 3: 287-93.
- . 2000. 'Pour une modélisation des profils cardiaques de postes', *Cahiers de Médecine Interprofessionnelle (CAMIP)*, 4: 409-16.
- . 2010. *Cardiofréquencemétrie pratique en milieu de travail* (Edition Docis: Paris).
- Midander, K., K. Elihn, A. Wallen, L. Belova, A. K. Karlsson, and I. O. Wallinder. 2012. 'Characterisation of nano- and micron-sized airborne and collected subway particles, a multi-analytical approach', *Sci Total Environ*, 427-428: 390-400.
- Mills, N. L., N. Amin, S. D. Robinson, A. Anand, J. Davies, D. Patel, J. M. de la Fuente, F. R. Cassee, N. A. Boon, W. Macnee, A. M. Millar, K. Donaldson, and D. E. Newby. 2006. 'Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans?', *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 426-31.
- Misrocchi, G., G. Sancini, F. Mantegazza, and G. Chiappino. 2008. 'Translocation pathways for inhaled asbestos fibers', *Environ Health*, 7: 4.
- Misra, S. K., A. Dybowska, D. Berhanu, S. N. Luoma, and E. Valsami-Jones. 2012. 'The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies', *Sci Total Environ*, 438: 225-32.
- Mitchev, K., P. Dumortier, and P. De Vuyst. 2002. 'Black Spots' and hyaline pleural plaques on the parietal pleura of 150 urban necropsy cases', *Am J Surg Pathol*, 26: 1198-206.
- Mohammad, A. K., L. K. Amayreh, J. M. Mazzara, and J. J. Reineke. 2013. 'Rapid lymph accumulation of polystyrene nanoparticles following pulmonary administration', *Pharm Res*, 30: 424-34.
- Mohammadipour, A., A. Fazel, H. Haghiri, F. Motejaded, H. Rafatpanah, H. Zabihi, M. Hosseini, and A. E. Bideskan. 2014. 'Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring', *Environ Toxicol Pharmacol*, 37: 617-25.
- Mohammed-Brahim, B., and A. Garrigou. 2009. 'Une approche critique du modèle dominant de prévention du risque chimique. L'apport de l'ergotoxicologie', *Activités*, 6: 49-67.
- Moller, P., L. Mikkelsen, L. K. Vesterdal, J. K. Folkmann, L. Forchhammer, M. Roursgaard, P. H. Danielsen, and S. Loft. 2011. 'Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis', *Crit Rev Toxicol*, 41: 339-68.
- Morgan, W. K., R. B. Reger, and D. M. Tucker. 1997. 'Health effects of diesel emissions', *Ann Occup Hyg*, 41: 643-58.
- Muller, K. M., I. Schmitz, and K. Konstantinidis. 2002. 'Black spots of the parietal pleura: morphology and formal pathogenesis', *Respiration*, 69: 261-7.
- Murphy, F. A., C. A. Poland, R. Duffin, K. T. Al-Jamal, H. Ali-Boucetta, A. Nunes, F. Byrne, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Li, S. J. Mather, A. Bianco, M. Prato, W. Macnee, W. A. Wallace, K. Kostarelos, and K. Donaldson. 2011. 'Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura', *Am J Pathol*, 178: 2587-600.
- Murphy, F. A., A. Schinwald, C. A. Poland, and K. Donaldson. 2012. 'The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells', *Part Fibre Toxicol*, 9: 8.

- Myllynen, P. K., M. J. Loughran, C. V. Howard, R. Sormunen, A. A. Walsh, and K. H. Vahakangas. 2008. 'Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta', *Reprod Toxicol*, 26: 130-7.
- Nakane, H. 2012. 'Translocation of particles deposited in the respiratory system: a systematic review and statistical analysis', *Environ Health Prev Med*, 17: 263-74.
- Naota, M., A. Shimada, T. Morita, K. Inoue, and H. Takano. 2009. 'Translocation pathway of the intratracheally instilled C60 fullerene from the lung into the blood circulation in the mouse: possible association of diffusion and caveolae-mediated pinocytosis', *Toxicol Pathol*, 37: 456-62.
- Nemmar, A., P. H. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M. F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, and B. Nemery. 2002. 'Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans', *Circulation*, 105: 411-4.
- Nikula, K. J., K. J. Avila, W. C. Griffith, and J. L. Mauderly. 1997. 'Sites of particle retention and lung tissue responses to chronically inhaled diesel exhaust and coal dust in rats and cynomolgus monkeys', *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 5: 1231-4.
- NIOSH. 2003. "Monitoring of Diesel Particulate Exhaust in the Workplace." In *Manual of Analytical Methods (NMAM)*, edited by PF O'Connor and PC Schlecht. Cincinnati: NIOSH.
- O'Hagan, D. T. 1996. 'The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery', *J Anat*, 189 (Pt 3): 477-82.
- Oberdorster, G., A. Elder, and A. Rinderknecht. 2009. 'Nanoparticles and the brain: cause for concern?', *J Nanosci Nanotechnol*, 9: 4996-5007.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. 'Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles', *Environ Health Perspect*, 113: 823-39.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, and C. Cox. 2004. 'Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain', *Inhal Toxicol*, 16: 437-45.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, A. Lunts, W. Kreyling, and C. Cox. 2002. 'Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats', *J Toxicol Environ Health A*, 65: 1531-43.
- Ostiguy, C., G. Lapointe, L. Ménard, Y. Cloutier, M. Trottier, M. Boutin, M. Antoun, and C. Normand. 2006a. "Nanoparticles. Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures." In, 100p. Montreal: IRSST.
- Ostiguy, Claude, Gilles Lapointe, Luc Ménard, Yves Cloutier, Mylène Trottier, Michel Boutin, Monty Antoun, and Christian Normand. 2006b. "Nanoparticles - Current Knowledge about Occupational Health and Safety Risks and Prevention Measures." In *Studies and Research Projects*, 100. Montreal: IRSST.
- Paasonen, P, A. Visshedjik, K. Kupiainen, Z. Klimont, H. Denier van der Gon, and M. Kulmala. 2013. "Aerosol particle number emissions and size distributions: Implementation in the GAINS model and initial results." In, 28. Laxenburg, Austria: IIASA International Institute for Applied Systems Analysis.
- Pairon, J. C., L. Martinon, and P. Brochard. 1998. '[Mineral analysis and study of asbestos pathology]', *Rev Mal Respir*, 15: 141-9.
- Pappas, R. S., N. Gray, N. Gonzalez-Jimenez, M. Fresquez, and C. H. Watson. 2015. 'Triple Quad-ICP-MS Measurement of Toxic Metals in Mainstream Cigarette Smoke from Spectrum Research Cigarettes', *J Anal Toxicol*.
- Park, C. W., Y. S. Rhee, F. G. Vogt, D. Hayes, Jr., J. B. Zwischenberger, P. P. DeLuca, and H. M. Mansour. 2012. 'Advances in microscopy and complementary imaging

- techniques to assess the fate of drugs ex vivo in respiratory drug delivery: an invited paper', *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 344-56.
- Park, E. J., E. Bae, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, S. H. Lee, J. Yoon, B. C. Lee, and K. Park. 2010. 'Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles', *Environ Toxicol Pharmacol*, 30: 162-8.
- Penconek, A., P. Drazyk, and A. Moskal. 2013. 'Penetration of diesel exhaust particles through commercially available dust half masks', *Ann Occup Hyg*, 57: 360-73.
- Pereira Ade, S., N. R. Grande, E. Carvalho, and A. Ribeiro. 1992. 'Evidence of drainage of tungsten particles introduced in the pleural space through the visceral pleura into the lung parenchyma', *Acta Anat (Basel)*, 145: 416-9.
- Petitot, F., P. Lestaevel, E. Tournalias, C. Mazzucco, S. Jacquinet, B. Dhieux, O. Delissen, B. B. Tournier, F. Gensdarmes, P. Beaunier, and I. Dublineau. 2013. 'Inhalation of uranium nanoparticles: respiratory tract deposition and translocation to secondary target organs in rats', *Toxicol Lett*, 217: 217-25.
- Phillips, J. I., F. Y. Green, J. C. Davies, and J. Murray. 2010. 'Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles', *Am J Ind Med*, 53: 763-7.
- Pietrojusti, A., L. Campagnolo, and B. Fadeel. 2013. 'Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers', *Small*, 9: 1557-72.
- Powell, J. J., N. Faria, E. Thomas-McKay, and L. C. Pele. 2010. 'Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract', *J Autoimmun*, 34: J226-33.
- Pradeau, C., V. Rondeau, E. Leveque, P. Y. Guernion, E. Tentillier, M. Thicoipe, and P. Brochard. 2015. 'Air pollution and activation of mobile medical team for out-of-hospital cardiac arrest', *Am J Emerg Med*, 33: 367-72.
- Qi, W., J. Bi, X. Zhang, J. Wang, J. Wang, P. Liu, Z. Li, and W. Wu. 2014. 'Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times', *Sci Rep*, 4: 4352.
- Rattanapinyopituk, K., A. Shimada, T. Morita, M. Sakurai, A. Asano, T. Hasegawa, K. Inoue, and H. Takano. 2014. 'Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles', *J Vet Med Sci*, 76: 377-87.
- Refuerzo, J. S., B. Godin, K. Bishop, S. Srinivasan, S. K. Shah, S. Amra, S. M. Ramin, and M. Ferrari. 2011. 'Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats', *Am J Obstet Gynecol*, 204: 546.e5-9.
- Rendall, R. E., J. I. Phillips, and K. A. Renton. 1994. 'Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process', *Ann Occup Hyg*, 38: 921-30.
- Rinaldo, M., P. Andujar, A. Lacourt, L. Martinon, M. Canal Raffin, P. Dumortier, J. C. Pairon, and P. Brochard. 2015. 'Perspectives in Biological Monitoring of Inhaled Nanosized Particles', *Ann Occup Hyg*.
- Ristovski, Z. D., B. Miljevic, N. C. Surawski, L. Morawska, K. M. Fong, F. Goh, and I. A. Yang. 2012. 'Respiratory health effects of diesel particulate matter', *Respirology*, 17: 201-12.
- Riviere, J. E. 2009. 'Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots', *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 26-34.
- Roggli, V. L., C. A. Piantadosi, and D. Y. Bell. 1986. 'Asbestos bodies in bronchoalveolar lavage fluid. A study of 20 asbestos-exposed individuals and comparison to patients with other chronic interstitial lung diseases', *Acta Cytol*, 30: 470-6.

- Roller, J., M. W. Laschke, T. Tschernig, R. Schramm, N. T. Veith, H. Thorlacijs, and M. D. Menger. 2011. 'How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung', *Nanomedicine (Lond)*, 7: 753-62.
- Rudell, B., M. C. Ledin, U. Hammarstrom, N. Stjernberg, B. Lundback, and T. Sandstrom. 1996. 'Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust', *Occup Environ Med*, 53: 658-62.
- Ryman-Rasmussen, J. P., M. F. Cesta, A. R. Brody, J. K. Shipley-Phillips, J. I. Everitt, E. W. Tewksbury, O. R. Moss, B. A. Wong, D. E. Dodd, M. E. Andersen, and J. C. Bonner. 2009. 'Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice', *Nat Nanotechnol*, 4: 747-51.
- Sa, L. T., S. Albernaz Mde, B. F. Patricio, M. V. Falcao, Jr., B. F. Coelho, A. Bordim, J. C. Almeida, and R. Santos-Oliveira. 2012. 'Biodistribution of nanoparticles: initial considerations', *J Pharm Biomed Anal*, 70: 602-4.
- Sadauskas, E., N. R. Jacobsen, G. Danscher, M. Stoltenberg, U. Vogel, A. Larsen, W. Kreyling, and H. Wallin. 2009. 'Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation', *Chem Cent J*, 3: 16.
- Sargent, L. M., D. W. Porter, L. M. Staska, A. F. Hubbs, D. T. Lowry, L. Battelli, K. J. Siegrist, M. L. Kashon, R. R. Mercer, A. K. Bauer, B. T. Chen, J. L. Salisbury, D. Frazer, W. McKinney, M. Andrew, S. Tsuruoka, M. Endo, K. L. Fluharty, V. Castranova, and S. H. Reynolds. 2014. 'Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes', *Part Fibre Toxicol*, 11: 3.
- Sarlo, K., K. L. Blackburn, E. D. Clark, J. Grothaus, J. Chaney, S. Neu, J. Flood, D. Abbott, C. Bohne, K. Casey, C. Fryer, and M. Kuhn. 2009. 'Tissue distribution of 20 nm, 100 nm and 1000 nm fluorescent polystyrene latex nanospheres following acute systemic or acute and repeat airway exposure in the rat', *Toxicology*, 263: 117-26.
- Saunders, M. 2009. 'Transplacental transport of nanomaterials', *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1: 671-84.
- Sauvain, J. J., M. S. Hohl, P. Wild, J. A. Pralong, and M. Riediker. 2014. 'Exhaled breath condensate as a matrix for combustion-based nanoparticle exposure and health effect evaluation', *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 27: 449-58.
- Schenker, M. B., K. E. Pinkerton, D. Mitchell, V. Vallyathan, B. Elvine-Kreis, and F. H. Green. 2009. 'Pneumoconiosis from agricultural dust exposure among young California farmworkers', *Environ Health Perspect*, 117: 988-94.
- Schleh, C., U. Holzwarth, S. Hirn, A. Wenk, F. Simonelli, M. Schaffler, W. Moller, N. Gibson, and W. G. Kreyling. 2013. 'Biodistribution of inhaled gold nanoparticles in mice and the influence of surfactant protein D', *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 26: 24-30.
- Schmid, O., W. Moller, M. Semmler-Behnke, G. A. Ferron, E. Karg, J. Lipka, H. Schulz, W. G. Kreyling, and T. Stoeger. 2009. 'Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles', *Biomarkers*, 14 Suppl 1: 67-73.
- Schneider, F., T. A. Sporn, and V. L. Roggli. 2010. 'Asbestos fiber content of lungs with diffuse interstitial fibrosis: An analytical scanning electron microscopic analysis of 249 cases', *Arch Pathol Lab Med*, 134: 457-61.
- Searl, A., and R. T. Cullen. 1997. 'An enzymatic tissue digestion method for fibre biopersistence studies', *Ann Occup Hyg*, 41: 721-7.
- Seaton, A., J. Cherrie, M. Dennekamp, K. Donaldson, J. F. Hurley, and C. L. Tran. 2005. 'The London Underground: dust and hazards to health', *Occup Environ Med*, 62: 355-62.
- Sebastien, P., X. Janson, A. Gaudichet, A. Hirsch, and J. Bignon. 1980. 'Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura', *IARC Sci Publ*: 237-46.

- Semmler-Behnke, M., W. G. Kreyling, J. Lipka, S. Fertsch, A. Wenk, S. Takenaka, G. Schmid, and W. Brandau. 2008. 'Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats', *Small*, 4: 2108-11.
- Semmler-Behnke, M., J. Lipka, A. Wenk, S. Hirn, M. Schaffler, F. Tian, G. Schmid, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2014. 'Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat', *Part Fibre Toxicol*, 11: 33.
- Semmler, M., J. Seitz, F. Erbe, P. Mayer, J. Heyder, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling. 2004. 'Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs', *Inhal Toxicol*, 16: 453-9.
- Shepard, M. N., and S. Brenner. 2014. 'An occupational exposure assessment for engineered nanoparticles used in semiconductor fabrication', *Ann Occup Hyg*, 58: 251-65.
- Shi, H., R. Magaye, V. Castranova, and J. Zhao. 2013. 'Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data', *Part Fibre Toxicol*, 10: 15.
- Shimada, A., N. Kawamura, M. Okajima, T. Kaewamatawong, H. Inoue, and T. Morita. 2006. 'Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse', *Toxicol Pathol*, 34: 949-57.
- Shinohara, N., T. Nakazato, M. Tamura, S. Endoh, H. Fukui, Y. Morimoto, T. Myojo, M. Shimada, K. Yamamoto, H. Tao, Y. Yoshida, and J. Nakanishi. 2010. 'Clearance kinetics of fullerene C(6)(0) nanoparticles from rat lungs after intratracheal C(6)(0) instillation and inhalation C(6)(0) exposure', *Toxicol Sci*, 118: 564-73.
- Singh, R., D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco, and K. Kostarelos. 2006. 'Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 3357-62.
- Song, Y., X. Li, and X. Du. 2009. 'Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma', *Eur Respir J*, 34: 559-67.
- Song, Y., X. Li, L. Wang, Y. Rojanasakul, V. Castranova, H. Li, and J. Ma. 2011. 'Nanomaterials in humans: identification, characteristics, and potential damage', *Toxicol Pathol*, 39: 841-9.
- Sonnegaard Poulsen, M., T. Mose, L. Leth Maroun, L. Mathiesen, L. Ehlert Knudsen, and E. Rytting. 2013. 'Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta', *Nanotoxicology*.
- Stark, W. J. 2011. 'Nanoparticles in biological systems', *Angew Chem Int Ed Engl*, 50: 1242-58.
- Stettler, L. E., D. D. Sharpnack, and E. F. Krieg. 2008. 'Chronic inhalation of short asbestos: lung fiber burdens and histopathology for monkeys maintained for 11.5 years after exposure', *Inhal Toxicol*, 20: 63-73.
- Stieb, D. M., L. Chen, M. Eshoul, and S. Judek. 2012. 'Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis', *Environ Res*, 117: 100-11.
- Sung, J. H., J. H. Ji, J. D. Park, M. Y. Song, K. S. Song, H. R. Ryu, J. U. Yoon, K. S. Jeon, J. Jeong, B. S. Han, Y. H. Chung, H. K. Chang, J. H. Lee, D. W. Kim, B. J. Kelman, and I. J. Yu. 2011. 'Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles', *Part Fibre Toxicol*, 8: 16.
- Sydbom, A., A. Blomberg, S. Parnia, N. Stenfors, T. Sandstrom, and S. E. Dahlen. 2001. 'Health effects of diesel exhaust emissions', *Eur Respir J*, 17: 733-46.
- Takahashi, Y., K. Mizuo, Y. Shinkai, S. Oshio, and K. Takeda. 2010. 'Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice', *J Toxicol Sci*, 35: 749-56.

- Takeda, Ken, Ken-ichiro Suzuki, Aki Ishihara, Miyoko Kubo-Irie, Rie Fujimoto, Masako Tabata, Shigeru Oshio, Yoshimasa Nihei, Tomomi Ihara, and Masao Sugamata. 2009. 'Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems', *J. Health Sci*, 55: 95-102.
- Takenaka, S., E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, W. Moller, M. Behnke-Semmler, L. Jennen, A. Walch, B. Michalke, P. Schramel, J. Heyder, and H. Schulz. 2006. 'Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung', *Inhal Toxicol*, 18: 733-40.
- Takenaka, S., E. Karg, W. G. Kreyling, B. Lentner, H. Schulz, A. Ziesenis, P. Schramel, and J. Heyder. 2004. 'Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles in the rat lung', *Inhal Toxicol*, 16 Suppl 1: 83-92.
- Takenaka, S., E. Karg, C. Roth, H. Schulz, A. Ziesenis, U. Heinzmann, P. Schramel, and J. Heyder. 2001. 'Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats', *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 4: 547-51.
- Tassinari, R., F. Cubadda, G. Moracci, F. Aureli, M. D'Amato, M. Valeri, B. De Berardis, A. Raggi, A. Mantovani, D. Passeri, M. Rossi, and F. Maranghi. 2014. 'Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen', *Nanotoxicology*, 8: 654-62.
- Theegarten, D., S. Boukercha, S. Philippou, and O. Anhenn. 2010. 'Submesothelial deposition of carbon nanoparticles after toner exposition: case report', *Diagn Pathol*, 5: 77.
- Tian, X., M. Zhu, L. Du, J. Wang, Z. Fan, J. Liu, Y. Zhao, and G. Nie. 2013. 'Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy', *Small*, 9: 2432-9.
- Tiede, K., A. B. Boxall, S. P. Tear, J. Lewis, H. David, and M. Hasselov. 2008. 'Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment', *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 25: 795-821.
- Tsutsumi, Y., and Y. Yoshioka. 2011. 'Quantifying the biodistribution of nanoparticles', *Nat Nanotechnol*, 6: 755.
- Tsyganova, N. A., R. M. Khairullin, G. S. Terentyuk, B. N. Khlebtsov, V. A. Bogatyrev, L. A. Dykman, S. N. Erykov, and N. G. Khlebtsov. 2014. 'Penetration of pegylated gold nanoparticles through rat placental barrier', *Bull Exp Biol Med*, 157: 383-5.
- Umezawa, M., H. Tainaka, N. Kawashima, M. Shimizu, and K. Takeda. 2012. 'Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information', *J Toxicol Sci*, 37: 1247-52.
- van der Zande, M., R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. Herrera Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. Peters, P. C. Hollman, P. J. Hendriksen, H. J. Marvin, A. A. Peijnenburg, and H. Bouwmeester. 2012. 'Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure', *ACS Nano*, 6: 7427-42.
- van Ravenzwaay, B., R. Landsiedel, E. Fabian, S. Burkhardt, V. Strauss, and L. Ma-Hock. 2009. 'Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: nano-TiO(2), pigmentary TiO(2) and quartz', *Toxicol Lett*, 186: 152-9.
- Wallenborn, J. G., J. K. McGee, M. C. Schladweiler, A. D. Ledbetter, and U. P. Kodavanti. 2007. 'Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats', *Toxicol Sci*, 98: 231-9.
- Wang, B., W. Y. Feng, T. C. Wang, G. Jia, M. Wang, J. W. Shi, F. Zhang, Y. L. Zhao, and Z. F. Chai. 2006. 'Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice', *Toxicol Lett*, 161: 115-23.
- Wang, H., S. T. Yang, A. Cao, and Y. Liu. 2013. 'Quantification of carbon nanomaterials in vivo', *Acc Chem Res*, 46: 750-60.

- Wang, J., C. Chen, Y. Liu, F. Jiao, W. Li, F. Lao, Y. Li, B. Li, C. Ge, G. Zhou, Y. Gao, Y. Zhao, and Z. Chai. 2008. 'Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO₂ nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases', *Toxicol Lett*, 183: 72-80.
- Wang, J., Y. Chen, B. Chen, J. Ding, G. Xia, C. Gao, J. Cheng, N. Jin, Y. Zhou, X. Li, M. Tang, and X. M. Wang. 2010. 'Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice', *Int J Nanomedicine*, 5: 861-6.
- Wang, J., Y. Liu, F. Jiao, F. Lao, W. Li, Y. Gu, Y. Li, C. Ge, G. Zhou, B. Li, Y. Zhao, Z. Chai, and C. Chen. 2008. 'Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles', *Toxicology*, 254: 82-90.
- Wang, T., H. Hsieh, Y. Hsieh, C. Chiang, Y. Sun, and C. Wang. 2012. 'The in vivo biodistribution and fate of CdSe quantum dots in the murine model: a laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry study', *Anal Bioanal Chem*, 404: 3025-36.
- WHO. 2013. "Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project." In, 122. Copenhagen, Denmark: World Health Organization.
- Wichmann, H. E. 2007. 'Diesel exhaust particles', *Inhal Toxicol*, 19 Suppl 1: 241-4.
- Wick, P., A. Malek, P. Manser, D. Meili, X. Maeder-Althaus, L. Diener, P. A. Diener, A. Zisch, H. F. Krug, and U. von Mandach. 2010. 'Barrier capacity of human placenta for nanosized materials', *Environ Health Perspect*, 118: 432-6.
- Wiebert, P., A. Sanchez-Crespo, J. Seitz, R. Falk, K. Philipson, W. G. Kreyling, W. Moller, K. Sommerer, S. Larsson, and M. Svartengren. 2006. 'Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs', *Eur Respir J*, 28: 286-90.
- Wu, J., C. Yu, Y. Tan, Z. Hou, M. Li, F. Shao, and X. Lu. 2015. 'Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats', *Environ Res*, 138c: 67-73.
- Wu, M., R. E. Gordon, R. Herbert, M. Padilla, J. Moline, D. Mendelson, V. Litle, W. D. Travis, and J. Gil. 2010. 'Case report: Lung disease in World Trade Center responders exposed to dust and smoke: carbon nanotubes found in the lungs of World Trade Center patients and dust samples', *Environ Health Perspect*, 118: 499-504.
- Xu, J., M. Futakuchi, H. Shimizu, D. B. Alexander, K. Yanagihara, K. Fukamachi, M. Suzui, J. Kanno, A. Hirose, A. Ogata, Y. Sakamoto, D. Nakae, T. Omori, and H. Tsuda. 2012. 'Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats', *Cancer Sci*, 103: 2045-50.
- Xu, Y., L. Barregard, J. Nielsen, A. Gudmundsson, A. Wierzbicka, A. Axmon, B. A. Jonsson, M. Karedal, and M. Albin. 2013. 'Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study', *Part Fibre Toxicol*, 10: 60.
- Yamashita, K., Y. Yoshioka, K. Higashisaka, K. Mimura, Y. Morishita, M. Nozaki, T. Yoshida, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, Y. Monobe, T. Imazawa, H. Aoshima, K. Shishido, Y. Kawai, T. Mayumi, S. Tsunoda, N. Itoh, T. Yoshikawa, I. Yanagihara, S. Saito, and Y. Tsutsumi. 2011. 'Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice', *Nat Nanotechnol*, 6: 321-8.
- Yang, H., C. Sun, Z. Fan, X. Tian, L. Yan, L. Du, Y. Liu, C. Chen, X. J. Liang, G. J. Anderson, J. A. Keelan, Y. Zhao, and G. Nie. 2012. 'Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy', *Sci Rep*, 2: 847.
- Yang, W., J. I. Peters, and R. O. Williams, 3rd. 2008. 'Inhaled nanoparticles--a current review', *Int J Pharm*, 356: 239-47.

- Yoshida, S., K. Hiyoshi, S. Oshio, H. Takano, K. Takeda, and T. Ichinose. 2010. 'Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring', *Fertil Steril*, 93: 1695-9.
- Yu, T., D. Hubbard, A. Ray, and H. Ghandehari. 2012. 'In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics', *J Control Release*, 163: 46-54.
- Zhang, X., J. Yin, C. Kang, J. Li, Y. Zhu, W. Li, Q. Huang, and Z. Zhu. 2010. 'Biodistribution and toxicity of nanodiamonds in mice after intratracheal instillation', *Toxicol Lett*, 198: 237-43.
- Zhu, M. T., W. Y. Feng, Y. Wang, B. Wang, M. Wang, H. Ouyang, Y. L. Zhao, and Z. F. Chai. 2009. 'Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment', *Toxicol Sci*, 107: 342-51.
- Zimmer, A. T., and A. D. Maynard. 2002. 'Investigation of the aerosols produced by a high-speed, hand-held grinder using various substrates', *Ann Occup Hyg*, 46: 663-72.
- Zocchi, L. 2002. 'Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover', *Eur Respir J*, 20: 1545-58.