



HAL
open science

Impact environnemental et sanitaire des particules de nickel émises par les activités minières en Nouvelle Calédonie

Ophélie Germande

► **To cite this version:**

Ophélie Germande. Impact environnemental et sanitaire des particules de nickel émises par les activités minières en Nouvelle Calédonie. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0282 . tel-03909186

HAL Id: tel-03909186

<https://theses.hal.science/tel-03909186>

Submitted on 21 Dec 2022

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 SCIENCES ET ENVIRONNEMENT
SPÉCIALITÉ GEOCHIMIE ET ECOTOXICOLOGIE

Par Ophélie GERMANDE

**IMPACT ENVIRONNEMENTAL ET SANITAIRE DES PARTICULES DE NICKEL
EMISES PAR LES ACTIVITES MINIERES EN NOUVELLE-CALEDONIE**

Sous la direction de Magalie BAUDRIMONT-LARUE et Isabelle BAUDRIMONT

Soutenue le 27 Octobre 2022

Membres du jury :

Mme BUDZINSKI Hélène	Directrice de Recherche	Université de Bordeaux	Présidente
Mme MOUNEYRAC Catherine	Professeure	Université Catholique de l'Ouest	Rapporteur
M. GARCON Guillaume	Professeur	Université de Lille	Rapporteur
Mme BIOLA-VIDAMMENT Armelle	Maitre de Conférences	Université Paris Saclay	Examineur
M. DOMINIQUE Yannick	Docteur	Université de Nouvelle-Calédonie	Examineur
Mme GUNKEL-GRILLON Peggy	Professeure	Université de Nouvelle-Calédonie	Invitée
Mme BAUDRIMONT-LARUE Magalie	Professeure	Université de Bordeaux	Co-directrice
Mme BAUDRIMONT Isabelle	Maitre de Conférences	Université de Bordeaux	Co-directrice

Impact environnemental et sanitaire des particules de nickel émises par les activités minières en Nouvelle-Calédonie

En produisant un peu plus de 158 000 tonnes de nickel (Ni) par an la Nouvelle-Calédonie fait partie des producteurs de Ni les plus importants au monde avec des sols riches en éléments traces métalliques. Cette exploitation massive de Ni est un enjeu économique majeur pour le pays (8 à 17 % du PIB annuel) au détriment de potentiels impacts environnementaux et sanitaires. En effet, l'exploitation de ces mines à ciel ouvert de latérites nickélifères entraîne l'émission de particules ultrafines de Ni et d'oxyde de nickel (NiO) disséminées dans l'environnement, par le vent, ou via le ruissellement des cours d'eau, mais également d'autres métaux présents dans ces sols. Ces particules peuvent, d'une part, être inhalées par les travailleurs des mines ainsi que par les populations environnantes, posant des questions relevant de la toxicologie humaine et, d'autre part, être transportées le long des cours d'eau douce proches des mines, pour se retrouver par dépôts ou lessivages vers l'aval jusqu'au lagon, impactant ainsi les organismes aquatiques, dont l'étude relève de l'écotoxicologie.

D'un point de vue environnemental, peu d'études ont été menées en Nouvelle-Calédonie. Cependant, des premiers travaux sur les cours d'eau douce proches des mines ont montré des taux de Ni très importants accumulés dans les organismes sous influence minière, notamment, dans les anguilles du Pacifique. De façon à pouvoir documenter l'importance des impacts toxiques potentiellement infligés aux anguilles présentes sur ces sites, différents types d'approches ont été menées : (i) L'analyse des impacts toxiques des métaux sur *Anguilla marmorata* prélevée *in situ* lors d'une mission (morphométries, taux de métaux dans les organes, transcriptomiques) ; (ii) L'impact d'une exposition aux nanoparticules (NPs) de NiO, NiONPs, sur des hépatocytes d'anguilles *in vitro*, le foie étant un organe essentiel chez les anguilles et une cible privilégiée de la toxicité des métaux. Ces approches ont permis de décrypter de façon précoce les mécanismes cellulaires et moléculaires d'impact cytotoxique, de stress oxydant, d'inflammation et de dysfonction mitochondriale.

Parallèlement, l'exposition humaine aux NPs est une préoccupation de santé publique. Les NPs peuvent ainsi franchir la barrière alvéolo-capillaire, se retrouver dans la circulation générale et y exercer des effets délétères par des interactions directes avec le système cardiovasculaire notamment, les cellules endothéliales (HPAEC) tapissant la lumière des vaisseaux et contrôlant la réactivité vasculaire, modifiée après exposition aux NPs de Ni. Ces effets pourraient ainsi être potentialisés dans les pathologies cardiovasculaires, telle que l'hypertension pulmonaire (HTP). Les personnes souffrant d'HTP pourraient donc constituer des populations à risque. Ainsi, il s'avère nécessaire de mieux caractériser, les mécanismes toxiques induits par des poussières riches en Ni et par les NiONPs sur le système cardiovasculaire. Pour cela nous avons étudié, sur des HPAEC, les effets induits par les NiONPs sur la signalisation calcique, la réponse pro-inflammatoire et le rôle de stress oxydant dans les modifications observées, ainsi que les impacts de ces NPs en condition pathologique en utilisant un modèle *in vitro* mimant la dynamique vasculaire observée lors de l'HTP avec le système d'étirement STREX®. Nos résultats montrent que l'exposition aux NiONPs induit un stress oxydant, une réponse pro-inflammatoire et des altérations de l'homéostasie calcique et que ces effets sont potentialisés lorsque les cellules sont en conditions pathologiques. Ces travaux suggèrent donc que l'exposition aux NiONPs pourrait aggraver certains événements physiopathologiques chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires préexistantes telles que l'HTP, et que ces patients seraient plus sensibles à ces polluants particuliers.

Mots clés : Nouvelle-Calédonie, activités minières, nanoparticules d'oxyde de nickel, cellules endothéliales d'artères pulmonaire humaines, hypertension pulmonaire, *Anguilla marmorata*, hépatocytes d'anguilles.

Environmental and health impact of nickel particles emitted by mining activities in New Caledonia

By producing about 158,000 tons of nickel (Ni) per year, New Caledonia is one of the largest producers of Ni in the world, with soils rich in trace metals (Ni; chromium, Cr; cobalt, Co; manganese, Mn and iron, Fe). This massive Ni exploitation is a major economic issue for the country (8 to 17% of annual GDP) to the detriment of potential environmental and health impacts. Indeed, the exploitation of these open-pit nickel laterite mines leads to the emission of ultrafine particles of Ni and nickel oxide (NiO) disseminated in the environment, by the wind, or via run-off from watercourses but also of other metals present in these soils. These particles can be inhaled by mine workers and the surrounding population, raising questions relating to human toxicology, and can also be transported along freshwater streams close to the mines, to be deposited or washed downstream as far as the lagoon, thus impacting aquatic organisms, the study of which is a matter of ecotoxicology.

From an environmental point of view, few studies have been conducted in New Caledonia. However, initial work on freshwater rivers near mines has shown very high levels of Ni accumulated in organisms under the mining influence, particularly in Pacific eels. In order to document the significance of the toxic impacts potentially inflicted on eels present at these sites, different types of approaches have been conducted: (i) Analysis of the toxic impacts of metals on *Anguilla marmorata* collected *in situ* during a mission (morphometric measurements, metal levels in organs, transcriptomic); (ii) Impact of exposure to NiO nanoparticles (NPs) on eel hepatocytes *in vitro*, the liver being a prime target of metal toxicity and an essential organ for eels. These approaches made it possible to early identify the cellular and molecular mechanisms of cytotoxic impact, oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction following this exposure.

In parallel, human exposure to NPs is a public health concern. NPs can thus cross the alveolar-capillary barrier, find their way into the general circulation and exert deleterious effects through direct interactions with the cardiovascular system and, in particular, the endothelial cells (HPAEC) lining the lumen of the vessels and controlling vascular reactivity, which is modified after Ni NPs exposure. These effects could thus be amplified in cardiovascular pathologies. People suffering from pathologies of the pulmonary circulation (pulmonary hypertension, PH) could therefore constitute populations at risk. Thus, it is necessary to better characterize, in exposed populations, the toxic mechanisms induced by Ni-rich dusts and by NiO NPs on the cardiovascular system. For this purpose, we studied, on HPAEC, the effects induced by NiO NPs on calcium signaling, the pro-inflammatory response and the role of oxidative stress in the observed modifications, as well as the impacts of these NPs in a pathological conditions by using an *in vitro* model mimicking the vascular dynamics observed during PH with the STREX® stretching system. Our results show that exposure to NiO NPs induces oxidative stress, a pro-inflammatory response as well as alterations in calcium homeostasis and that these effects are amplified when the cells are under pathological conditions. This work therefore suggests that exposure to NiO NPs could aggravate some pathophysiological events in patients suffering from pre-existing cardiovascular diseases such as PH, and that these patients would be more sensitive to these particulate pollutants.

Key words : New Caledonia, mining activities, nickel oxide nanoparticles, human pulmonary artery endothelial cells, pulmonary hypertension, *Anguilla marmorata*, eel hepatocytes.

UNITES DE RECHERCHE

Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux, EPOC, Unité Mixte de
Recherche, UMR 5805

Equipe Ecotoxicologie Aquatique

Station Marine d'Arcachon, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon



Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, CRCTB, Institut National de la Santé et de
la Recherche Médicale, INSERM U1045

Equipe 1 – Physiopathologie de la circulation pulmonaire

Hôpital Xavier Arnoz, PTIB, Avenue du Haut Lévêque, 33600 Pessac



REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Isabelle et Magalie de m'avoir fait confiance en me présentant au concours de l'École Doctorale il y a maintenant 3 ans. Merci à toutes les deux de m'avoir permis de faire en quelques sortes deux doctorats en un seul, c'était pour moi une opportunité unique et je n'aurai pu rêver mieux comme sujet. Malgré le COVID et un accident de ski, nous avons réussi, je pense, à sortir de beaux résultats durant ces 3 années grâce à vos soutiens en toutes circonstances.

Isabelle merci de m'avoir mise sur la voie de la Recherche et de ce sujet. Tu m'as fait découvrir cet univers lors de mon stage de Master 2, univers que je ne connaissais pas et qui m'a tellement plu que j'ai voulu continuer. Tu as accepté fin 2019 d'être ma directrice de Thèse d'Exercice de Pharmacie, puis nous avons enchainé sur 3 années de Thèse de Recherche. Merci de m'avoir autant fait confiance en me laissant toujours libre et autonome, en me laissant encadrer des stagiaires, en me permettant de partir en congrès ou encore en me proposant de donner des cours notamment dans le DEUST des Sapeurs-Pompiers ! Merci pour ton écoute et ta disponibilité.

Magalie un très grand merci également à toi qui a su me faire confiance sur un domaine que je ne maîtrisais pour le coup pas du tout, l'écotoxicologie !! Domaine que je suis désormais ravie d'avoir découvert. Nous nous voyions peu mais nos échanges ont toujours été très enrichissants, agréables et bienveillants. Merci surtout de m'avoir permis de partir en mission avec toi en Nouvelle-Calédonie, c'était une expérience inoubliable et incroyable. Cela a également été l'occasion de mieux nous connaître. J'ai apprécié chaque moment de cette mission, que ce soient les pêches et les dissections pas toujours simples avec les anguilles filantes, ou encore nos week-ends à partir visiter des recoins de l'île. Merci pour ton entière disponibilité en toutes circonstances et ton incroyable réactivité.

Je remercie le Pr Roger Marthan puis le Pr Patrick Berger, ancien et nouveau directeur du CRCTB ainsi que le Dr Hélène Budzinski, directrice d'EPOC, pour vos accueils dans vos laboratoires.

Je remercie Christelle Guibert, cheffe de l'équipe 1 au CRCTB ainsi qu'Alexia Legeay et Jérôme Cachot, responsables de l'équipe EA à EPOC pour vos accueils dans vos équipes.

Je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de participer à ce jury de Thèse. Je remercie le Dr Hélène Budzinski, le Pr Catherine Mouneyrac et le Pr Guillaume Garçon.

Un merci particulier au Dr Armelle Biola-Vidamment qui m'a formée au domaine de la Toxicologie lors de mes études de Pharmacie et qui, après avoir accepté d'être ma Présidente de jury de Thèse d'Exercice de Pharmacie a accepté d'être jury de cette Thèse. Merci Mme Biola-Vidamment pour votre formation, vos bons conseils et votre gentillesse.

Je remercie également les Dr Yannick Dominique et Peggy Gunkel-Grillon, qui, en plus de faire partie de ce jury, m'ont accueillie en Nouvelle-Calédonie pour la mission de terrain. Merci Peggy pour votre

gentillesse et votre accueil bienveillant à l'Université de Nouméa. Merci Yannick pour avoir organisé la mission et nous avoir aidé pour les pêches et surtout pour les dissections !!

Je remercie tous mes collègues des deux laboratoires d'accueils, en particulier Cerise, Emilie et Patrice à EPOC pour m'avoir formée sur vos domaines respectifs, et tous les thésards, techniciens et ingénieurs du CRCTB en particulier Paul et Isabel pour vos nombreux conseils sur les RT-qPCR !!

Je remercie tous les membres des équipes 1 et 2 du CRCTB que j'ai côtoyé tous les jours pendant 3 ans et demi, notamment les nombreux thésards avec lesquels j'ai partagé mon bureau et de bons moments.

Je remercie particulièrement Juliette Deweydt, ancienne thésarde puis ATER de l'équipe 1, qui après m'avoir formée lors de mon stage de M2 m'a accompagnée jusqu'au concours et pendant ma première année de Thèse. Merci à toi ma mini boss pour m'avoir formée sur toutes les techniques toujours dans la bonne humeur, tu es devenue aujourd'hui une réelle amie et c'est en partie grâce à toi que j'en suis là professionnellement.

Un merci particulier à certains collègues devenus bien plus que ça au cours de ces années, en devenant aujourd'hui de vrais amis. Merci Céline, une gestionnaire en or, Marilyne, notre spécialiste de nos amis (ou pas) les rongeurs et Fabien, notre médecin spécialiste dans à peu près tous les domaines. Merci à vous trois d'avoir égayés tous mes midis et quelques soirées. Mes années de Thèse n'auraient pas été aussi joyeuses sans vous. Nous avons beaucoup, beaucoup ri et ce n'est que le début ! Merci également à Clément, présent depuis que je suis arrivée en M2 au CRCTB mais très présent depuis plusieurs mois... Merci de m'avoir soutenue et encouragée sur la fin de ma Thèse et surtout de m'avoir fait beaucoup rire.

Je remercie ma famille, mes parents, mon frère et ma sœur, pour leur soutien indéfectible depuis le début de mes études il y a 9 ans, toujours dans une ambiance joyeuse et bienveillante ! Merci d'essayer de comprendre ce que je fais ce qui n'est pas chose facile ! Merci d'être présents à ma soutenance qui signe la fin de mes années étudiantes ! Un merci également à Margaux et Mathieu qui en rejoignant la famille ont dû également se mettre à la page des exploitations minières en Nouvelle-Calédonie !

Enfin, je remercie tous mes amis présents depuis plus ou moins longtemps en particulier Thomas, Fanny, Pauline, Léa, Maud, Marine, Elsa, Valentin et Éléonore. Un merci spécial à ma binôme d'études du début à la fin, Éléonore. Après avoir soutenu notre Thèse d'Exercice le même jour nous avons eu la chance toutes les deux de continuer en Thèse de Recherche. Ma Thèse n'aurait pas été la même si je ne t'avais pas eu sur ces 3 ans notamment avec nos appels hebdomadaires où nous nous racontions pourquoi nos manip n'ont pas fonctionnées !! Tu es bien plus qu'une simple amie et je sais que nous allons continuer encore un long chemin côte à côte.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	23
FORMATIONS	27
INTRODUCTION	29
ETAT DE L'ART	35
PARTIE 1 : CONTEXTE GÉOLOGIQUE ET ACTIVITÉS MINIÈRES EN NOUVELLE-CALÉDONIE	37
PARTIE 2 : LA POLLUTION	43
1. LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE	43
1.1. <i>Définition</i>	43
1.2. <i>Les différents types de polluants atmosphériques</i>	44
1.2.1. Polluants atmosphériques primaires	44
1.2.2. Polluants atmosphériques secondaires	46
1.2.3. Polluants atmosphériques particuliers	47
1.3. <i>Réglementation française</i>	51
1.4. <i>Réglementation des particules de nickel dans l'atmosphère</i>	52
2. LA POLLUTION DANS LES COURS D'EAU DOUCE	54
2.1. <i>Définition</i>	54
2.2. <i>Les différents types de polluants</i>	56
2.2.1. Macropolluants.....	56
2.2.2. Micropolluants : les métaux	57
2.3. <i>Réglementation française pour la surveillance de la qualité des eaux</i>	64
2.4. <i>Réglementation de la contamination en nickel dans l'eau en Nouvelle Calédonie</i>	66
PARTIE 3 : LES MODÈLES BIOLOGIQUES ÉTUDIÉS	68
1. TOXICOLOGIE HUMAINE : CELLULES ENDOTHÉLIALES D'ARTÈRES PULMONAIRES	68
1.1. <i>Les cellules endothéliales, cibles des nanoparticules</i>	69
1.2. <i>L'homéostasie calcique dans les cellules endothéliales</i>	71
1.2.1. Le calcium dans le réticulum endoplasmique.....	72

1.2.2.	Le calcium mitochondrial.....	74
1.2.3.	Le calcium extracellulaire	76
1.2.4.	Régulation du tonus vasculaire via le monoxyde d'azote.....	78
1.2.5.	Les autres facteurs vasodilatateurs	79
1.3.	<i>Les autres facteurs vasoconstricteurs non dépendants du calcium</i>	80
1.4.	<i>L'hypertension pulmonaire</i>	81
1.4.1.	Définition et classification	81
1.4.2.	Physiopathologie de l'HTP	82
1.4.3.	Signes cliniques et traitements.....	84
1.4.4.	Pollution atmosphérique et hypertension pulmonaire	85
2.	ÉCOTOXICOLOGIE : LES ANGUILES, POISSONS DE FIN DE CHAÎNE TROPHIQUE	86
2.1.	<i>Les anguilles, poissons migrateurs</i>	86
2.1.1.	Présentation des anguilles.....	86
2.1.2.	Cycle de vie des anguilles	88
2.2.	<i>L'importance de la fonction hépatique</i>	91
2.2.1.	La détoxification	91
2.2.2.	La synthèse et le stockage lipidique	92
2.2.3.	Synthèse de la vitellogénine	94
2.3.	<i>Les anguilles : certaines populations en déclin</i>	95
2.3.1.	Comment les anguilles peuvent-elles être exposées aux métaux ?	96
2.3.2.	L'impact d'une exposition des anguilles aux métaux	97
2.3.3.	Le foie : organe cible de la toxicité des métaux.....	98
PARTIE 4 : POURQUOI LES PUF ET NPS SONT-ELLES TOXIQUES ?		101
1.	TOXICITÉ DES PUF ET DES NPS	101
1.1.	<i>La notion de réactivité de surface</i>	101
1.2.	<i>Le stress oxydant</i>	102
1.3.	<i>L'inflammation</i>	106
1.4.	<i>L'homéostasie calcique</i>	107
1.5.	<i>Dysfonction mitochondriale et apoptose</i>	108
2.	TOXICITÉ DES PARTICULES DE NICKEL	111
2.1.	<i>Études épidémiologiques</i>	112
2.1.1.	Données dans les raffineries de nickel	112
2.1.2.	Données épidémiologiques en Nouvelle-Calédonie	113
2.2.	<i>Études in vivo</i>	114
2.2.1.	Chez les rongeurs.....	114
2.2.2.	Chez les poissons	115
2.3.	<i>Études in vitro</i>	117
2.3.1.	Cellules Humaines : A-549 et BEAS-2B.....	117
2.3.2.	Hépatocytes.....	118

OBJECTIFS.....	121
MATERIELS ET METHODES	127
PARTIE 1 : MATÉRIELS.....	129
1. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	129
2. LES DIFFÉRENTES PARTICULES ET SELS DE NICKEL UTILISÉS	131
2.1. <i>Les nanoparticules d'oxyde de nickel (NPs de NiO)</i>	<i>131</i>
2.2. <i>Les sels de nickel, NiCl₂</i>	<i>131</i>
2.3. <i>Les particules de latérites</i>	<i>132</i>
3. LA CULTURE CELLULAIRE	132
3.1. <i>Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, HPAEC</i>	<i>132</i>
3.2. <i>Hépatocytes d'Anguilles du Japon, Anguilla japonica, Hepa-E1.....</i>	<i>134</i>
4. DÉMARCHES EXPÉRIMENTALES POUR LES EXPÉRIMENTATIONS IN VITRO	135
5. ANGUILLES DU PACIFIQUE, ANGUILLA MARMORATA	137
PARTIE 2 : MÉTHODES	138
1. CARACTÉRISATION DES NPS DE NiO	138
1.1. <i>Distribution hydrodynamique de la taille</i>	<i>138</i>
1.2. <i>Internalisation des NPs de NiO</i>	<i>139</i>
2. ÉVALUATION DU STRESS OXYDANT ACELLULAIRE DES NPS DE NiO.....	140
3. DOSAGE DU NICKEL DISSOUS DANS LES MILIEUX DE CULTURE DES CELLULES.....	141
4. DOSAGE DES PROTÉINES.....	141
5. ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ	141
6. ÉVALUATION DE L'APOPTOSE.....	142
6.1. <i>Annexin V / Iodure du propidium dans les cellules HPAEC</i>	<i>142</i>
6.2. <i>Production de la caspase 9 dans les cellules HEPA-E1.....</i>	<i>143</i>
7. ÉVALUATION DU STRESS OXYDANT CELLULAIRE.....	144
7.1. <i>Evaluation des ERO globale par la sonde CM-H₂DCF-DA.....</i>	<i>144</i>
7.2. <i>Dosage de l'anion superoxyde cytoplasmique par résonance paramagnétique électronique</i>	<i>145</i>
7.3. <i>Dosage de l'anion superoxyde mitochondrial par microscopie confocale</i>	<i>147</i>
8. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE	148
9. ÉVALUATION DE LA RÉPONSE PRO-INFLAMMATOIRE : DOSAGE DES INTERLEUKINES-6	149
10. ÉVALUATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE	149
10.1. <i>Mesure du calcium cytoplasmique</i>	<i>149</i>
10.2. <i>Mesure du calcium mitochondrial</i>	<i>150</i>
10.3. <i>Mesure du calcium du réticulum endoplasmique.....</i>	<i>151</i>
11. ÉVALUATION DU MONOXYDE D'AZOTE ET DES NITRITES ET NITRATES	152
11.1. <i>Mesure du monoxyde d'azote (NO) au microscope confocal</i>	<i>152</i>

11.2. Dosage des métabolites du NO, les nitrites et les nitrates	153
12. DOSAGE DE L'ENDOTHÉLINE-1	153
13. ÉVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE	154
13.1. Mesure du potentiel de membrane mitochondriale	154
13.2. Mesure de la masse mitochondriale	155
14. ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES	156
14.1. Etudes en qPCR pour les cellules HPAEC	156
14.2. Etudes en qPCR pour les HEPA-E1 et les échantillons d'Anguilla marmorata	157
15. DOSAGE DES MÉTAUX.....	160
16. ANALYSES STATISTIQUES	161
RESULTATS	163
OBJECTIF 1 : QUELS SONT LES MÉCANISMES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE LA TOXICITÉ DES NPS DE NiO ET DES LATÉRITES NICKÉLIFÈRES SUR DES CELLULES EN CULTURE <i>IN VITRO</i> ?	165
1. CELLULES VASCULAIRES PULMONAIRES HUMAINES EXPOSÉES AUX NPS DE NiO	165
2. HÉPATOCYTES D'ANGUILLES EXPOSÉS AUX NPS DE NiO ET AUX SELS DE NiCl ₂	193
3. CELLULES VASCULAIRES PULMONAIRES HUMAINES EXPOSÉES AUX LATÉRITES NICKÉLIFÈRES	211
OBJECTIF 2 : QUELS SONT LES IMPACTS AU NIVEAU FONCTIONNEL D'UNE EXPOSITION AUX MÉTAUX ET AUX OXYDES DE NICKEL ?	235
1. MODÈLE PATHOLOGIQUE <i>IN VITRO</i> MIMANT UNE DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE : LES EFFETS NOCIFS DES NPS DE NiO SONT-ILS AMPLIFIÉS SUR DES CELLULES VASCULAIRES HUMAINES CULTIVÉES EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES ?	235
2. <i>ANGUILLA MARMORATA</i> : CIBLE DE LA CONTAMINATION DES RIVIÈRES AUX MÉTAUX : PREMIÈRE ÉTUDE SUR LA BIOACCUMULATION DES MÉTAUX ET LA TRANSCRIPTION DES GÈNES CHEZ <i>ANGUILLA MARMORATA</i> VIVANT DANS DES RIVIÈRES SOUS INFLUENCE MINIÈRE EN NOUVELLE-CALÉDONIE	257
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	273
PARTIE 1 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	275
PARTIE 2 : PERSPECTIVES DE RECHERCHES	283

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Concept One Health appliqué sujet de Thèse.....	33
Figure 2 : Profil d'altération sur périodotites).....	37
Figure 3 : La Nouvelle-Calédonie et les sites miniers.....	38
Figure 4 : Production mondiale de nickel au cours des 150 dernières années	39
Figure 5 : Chantier de construction de l'usine Métallurgique de PRNC	42
Figure 6 : Schéma des principales sources de polluants atmosphériques.....	46
Figure 7 : Ordre de grandeurs des particules atmosphériques dont les nanoparticules	47
Figure 8 : Dépôt de particules inhalées selon la région anatomique.....	50
Figure 9 : Evolution des concentrations moyennes annuelles en nickel (ng/m ³) selon scal-air....	54
Figure 10 : Augmentation de la turbidité de la rivière du village de Poro et à son embouchure après de fortes pluie en avril 2011.....	56
Figure 11 : Origine des polluants de l'eau.....	57
Figure 12 : Bioaccumulation du mercure le long de la chaîne trophique.....	60
Figure 13 : Formes prises par les métaux dans les eaux de surface : cas du cuivre.	61
Figure 14 : Spéciation du Ni dans les eaux douces et les eaux marines	63
Figure 15 : Paramètres suivis dans le cadre de la DCE.....	66
Figure 16 : Les CE à la face interne des artères à l'interface entre le sang et le tissu	69
Figure 17 : Schéma de la barrière alvéolo-capillaire et échanges gazeux au niveau des alvéoles	71
Figure 18 : Schéma des différents canaux calciques présents à la membrane du RE dans les CE.	73
Figure 19 : Structure d'une mitochondrie.....	74
Figure 20 : Apoptose induite par le stress du RE avec un excès de calcium.....	76
Figure 21 : Protéines impliquées dans les dynamiques calciques reliées au milieu extracellulaire et à la membrane plasmique.	78
Figure 22 : Voies des molécules vasodilatatrices des CE vers les CML.	80
Figure 23 : Nouvelle classification diagnostique de l'hypertension pulmonaire.	82
Figure 24 : Remodelage artériel	84
Figure 25 : Répartition géographique des <i>Anguilla marmorata</i>	87
Figure 26 : Anguille marbrée, <i>Anguilla marmorata</i>	87
Figure 27 : Cycle de vie de l'anguille marbrée	91

Figure 28 : Schéma représentant l'implication des cellules hépatocytaires dans le métabolisme des lipides.....	96
Figure 30 : Réactivité de surfaces des NPs en fonction de leur taille	101
Figure 31 : Réactivité de surface des nanoparticules	103
Figure 32 : Chaîne respiratoire mitochondriale	103
Figure 33 : Production des ERO et ERN.	104
Figure 34 : ERO et stress oxydant.....	105
Figure 35 : Les NPs peuvent activer les ROS pour entraîner l'apoptose.....	110
Figure 36 : Les NPs peuvent endommager directement les mitochondries.....	110
Figure 37 : Résumé des objectifs.....	126
Figure 38 : Cellules HPAEC en culture observées au microscope à contraste de phase	133
Figure 39 : Appareil STREX®	134
Figure 40 : Cellules HEPA-E1 en culture observées au microscope à contraste de phase 1	135
Figure 41 : Pêche des poissons par pêche électrique sur les cours d'eau	137
Figure 42 : Mécanisme d'action de la sonde CM-H ₂ DCF-DA.....	137
Figure 43 : Mécanisme de détection indirecte de l'activité enzymatique de la SOD	144
Figure 44 : Viabilité cellulaire après une exposition de 24 heures au NiCl ₂	206
Figure 46 : : Production d'ERO globales après 4h d'exposition au NiCl ₂	207
Figure 47 : Sécrétion d'IL-6 après 24h d'exposition au NiCl ₂	207
Figure 48 : Schéma résumé du mécanisme d'action toxique des NPs de NiO dans les cellules HEPA-E1	209
Figure 49 : Schéma de conclusion générale, mécanisme d'action toxique des NPs de NiO	277
Figure 50 : Schéma de conclusion sur les effets des métaux sur les anguilles marbrées en Nouvelle-Calédonie.....	280
Figure 51 : Schéma de conclusion finale sur les principaux résultats de la Thèse.....	282
Figure 52 : Modèle de co-culture cellules HPAEC – NHBE.	284
Figure 53 : Approche des milieux conditionnés.	284
Figure 54 : Schéma du processus mis en évidence lors de la maturation de l'anguille européenne femelle provoqués artificiellement.....	284

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques	51
Tableau 2 : Composition du Mac/Krebs	130
Tableau 3 : Composition du Krebs-HEPES	130
Tableau 4 : Détection des organites de la cellule par sonde fluorescente	131
Tableau 5 : Expérimentation réalisées sur les cellules HPAEC et HEPA-E1.....	136
Tableau 6 : Nombre d'individus par site de prélèvement.....	138
Tableau 7 : Séquences des gènes étudiés dans les HPAEC	157
Tableau 8 : Séquences des gènes étudiés chez <i>Anguilla marmorata</i>	159
Tableau 9 : Séquences des gènes étudiés dans les hépatocytes d' <i>Anguilla japonica</i>	160

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$[Ca^{2+}]_{EC}$: Concentration calcique extracellulaire

$[Ca^{2+}]_i$: Concentration calcique intracellulaire

$[Ca^{2+}]_m$: Concentration calcique mitochondriale

$[Ca^{2+}]_{re}$: Concentration calcique réticulaire

ΨMP : Potentiel de membrane mitochondriale

5-HT : Sérotonine

A549 : Human lung epithelial A549 cells

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AG : Acide gras

ATP : Adénosine triphosphate

Al : Aluminium

As : Arsenic

AVK : Anti vitamine K

BEAS-2B : Human bronchial epithelial BEAS-2B cells

BFGF : Basic Fibroblast Growth Factor

BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive

BSA : Bovine serum albumine

C_6H_6 : Benzène

Ca^{2+} : Calcium

CAT : Catalase

Cd : Cadmium

CE : Cellules endothéliales

CI50 : Concentration inhibitrice 50%

CIRC : Centre International de la Recherche sur le cancer

CM-H₂DCF-DA : 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate, acétyl ester

CML : Cellules musculaires lisses

CNRT-Ni : Centre National de Recherche Technologique – Nickel

CO₂ : Dioxyde de carbone

Cox : Oxydes de carbones
Co : Cobalt
COV : Composés organiques volatiles
Cr : Chrome
CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale
CRP : Protéine C réactive
Cu : Cuivre
CytC : Cytochrome C
d_am : Diamètre aérodynamique moyen
DAVAR : Direction des affaires vétérinaires alimentaires et rurales à travers son service de l'eau
DASS-NC : Direction des Affaires sanitaires et sociales-Nouvelle Calédonie
DETC : Diéthylthiocarbamate de sodium
DF : Déféroxamine
DCE : Directive cadre sur l'eau
DLS : Diffusion dynamique de la lumière
DMML : Dispersion des métaux de la mine au lagon
DMT1 : Transporteurs de métaux divalents 1
E2 : Œstradiol
ECETOC : European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center
ECGM : Endothelial cell growth medium
ECGS : Endothelial cell growth supplement
EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EGF : Epidermal Growth Factor
EGTA : Acide egtazique
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ERDF-M : Milieu ERDF
e-NOS : endothéliale monoxyde d'azote synthase
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ET-1 : Endothéline-1
ETM : Éléments traces métalliques
ERN : Espèces réactives de l'azote
Fe : Fer
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPX : Glutathion peroxydase
GTP : Guanosine triphosphate

H₂O : Eau
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HEPA-E1 : Hepatocytes of eel-1
Hg : Mercure
HO-1 : Hème oxygénase
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
HPAEC : Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
HTP : Hypertension pulmonaire
ICMCB : Institut de la chimie de la matière condensée de Bordeaux
IL : Interleukines
INRS : Institut National de la Recherche et de la Sécurité
IP₃ : Inositol 1,4,5-triphosphate
IP₃R : Récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate
K : Potassium
KHB : Krebs-HEPES bicarbonate
KNS-SAS : Koniambo-Nickel SAS
L15M : Milieu Leibovitz L-15
LTPIB : Laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux
MBC : Milieu blanc complet
MBSS : Milieu blanc sans sérum
mCU : mitochondria Calcium Uniporter
MES : Matières en suspension
MET : Microscopie électronique à transmission
Mg²⁺ : Magnésium
Mn : Manganèse
mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore
MT : Métallothionéines
MRC : Milieu rouge complet
N : Azote
Na⁺ : Sodium
NEC : Courant équatorial du Pacifique Nord
NH₃ : Ammoniac
Ni : Nickel

NiCl₂ : Chlorure de nickel
NiCO₃ : Nickel(II) carbonate
Ni(OH)₂ : Hydroxyde de nickel
NiSO₄ : Sulfate de nickel
NiO : Oxyde de nickel
NO₂⁻ : Nitrites
NO₂ : Dioxyde d'azote
NO₃⁻ : Nitrates
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Monoxyde d'azote synthase
NO_x : Oxydes d'azote
NPs : Nanoparticules
NQE : Norme qualité eau
O₂ : Dioxygène
O₂⁻ : Anion superoxyde
O₃ : Ozone
OH· : Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Onema : Office national de l'eau et des milieux aquatiques
ONNO : Peroxynitrites
P : Phosphate
PAPm : Pression artérielle pulmonaire moyenne
PCB : Polychlorobiphényle
Pb : Plomb
PBS : Phosphate buffered saline
PEG : Polyéthylène glycol
PGI₂ : Prostacycline
PIB : Produit intérieur brut
PM : Particulate matter
PM_{0.1} : Particulate matter (d_{am} < 100 nm)
PM_{2.5} : Particulate matter (d_{am} < 2.5 µm)
PM₁₀ : Particulate matter (d_{am} < 10 µm)
PMCA : Plasma Member Calcium ATPase
PTS : Particules totales en suspension
PUF : Particules ultrafines

QUAVAR : Qualité des eaux douces et valeurs de rejet pour les cours d'eau des milieux ultramafiques

RT-qPCR : Polymerase chain reaction quantitative à transcription inverse

TG : Triglycérides

TGL : Triglycérides lipase

TiO₂ : Dioxyde de titane

TRPA : Transition Receptor Potential Ankyrin

TRPs : Transition Receptor Potential

TRPV : Transition Receptor Potential Vanilloid

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RE : Réticulum endoplasmique

RPE : Résonance paramagnétique électronique

RyR : Récepteurs à la ryanodine

SAC : Stretch activated channels

SERCA : Sarco endoplasmique réticulum Ca²⁺-ATPase

SiO₂ : Dioxyde de Silice

SLN : Société le nickel

SO₂ : Dioxyde de soufre

SOCE : Store Operated Calcium Entry

SOD : Superoxyde dismutase

SVF : Sérum de veau fœtal

SxOy : Oxydes de soufres

tBHQ : 2,5-di(t-buthyl)hydroquinon

TNS : Trypsin neutralizing solution

TRPV : Transient receptor potential vanilloid

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

VDAC : Voltage Dependant Anion Channel

VLDL : Very low density lipoprotein

WST : Water soluble tetrazolium

XO : Xanthine oxidase

Zn : Zinc

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Articles

Germande O; Barbault M; Sandri ML; Vecco-Garda C; Mornet S; Gunkel-Grillon P; Lacomme S; Gontier E; Poupin E; Ducret T; Quignard JF; Freund-Michel V; Cardouat G; Muller B; Vacher P; Berger P; Guibert C; Baudrimont M and Baudrimont I. Impacts of New Caledonian nickel-rich laterite particles on human pulmonary artery endothelial cells: oxidative stress, inflammation and calcium signaling disruption. En préparation

Germande O; Baudrimont M; Beaufiles F; Freund-Michel V; Ducret T; Quignard JF; Errera MH; Lacomme S; Gontier E; Mornet S; Bejko M; Muller B; Marthan R; Guibert C; Deweirdt J and Baudrimont I. NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption. *Nanotoxicology* 1-23 (2022). DOI : 10.1080/17435390.2022.2030821

Germande O; Beaufiles F; Daffe G; Gonzalez P; Mornet S; Bejko M; Errera MH; Lacomme S; Gontier E; Guibert C; Baudrimont I and Baudrimont M. Cellular and molecular mechanisms of NiONPs toxicity on eel hepatocytes HEPA-E1: An illustration of the impact of Ni release from mining activity in New Caledonia. *Chemosphere* 303 (2022) 135158. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.135158

Germande O; Ducret T; Quignard JF; Deweirdt J; Freund-Michel V; Errera MH; Cardouat G; Vacher P; Muller B; Berger P; Guibert C; Baudrimont M and Baudrimont I. NiONPs-induced oxidative stress and mitochondrial impairment in an *in vitro* pulmonary vascular cells model mimicking endothelial dysfunction. *Antioxidants (Basel)*, 11(2022). DOI: 10.3390/antiox11050847

Germande O; Gunkel-Grillon P; Dominique Y; Feurtet-Mazel A; Bierque E; Dassié E; Daffe G; Pierron F; Baudrimont I and Baudrimont M. Impact of nickel mining in New Caledonia on marbled eels *Anguilla marmorata*. *HAZMAT* 436 (2022). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129285

Congrès et séminaires

2022 :

- **J2R, Journées de la Recherche Respiratoire**, Reims : 15-16 octobre 2022 - Communication affichée

Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Christelle Guibert, Magalie Baudrimont et Isabelle Baudrimont. Implication du stress oxydant et de la signalisation calcique dans les altérations

induites par des nanoparticules d'oxyde de nickel dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine.

- **EuroTox 2022**, Maastricht, Pays-Bas : 18-21 Septembre 2022 – Communication affichée.
Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Thomas Ducret, Bernard Muller, Magalie Baudrimont and Isabelle Baudrimont. Involvement of oxidative stress and mitochondrial disruption in NiONPs – induced toxic effects in an *in vitro* pulmonary vascular model mimicking endothelial dysfunction.

- **SETAC 2022**, Copenhague, Danemark : 15-19 Mai 2022 – Communication affichée
Ophélie Germande, Isabelle Baudrimont, Peggy Gunkel-Grillon, Yannick Dominique, Guillemine Daffe, Emilie Dassié and Magalie Baudrimont. Release of nickel particles from mining activity in New Caledonia: organs disruption on eels, *Anguilla marmorata*.

2021 :

- **PTIM (Pollutant Toxic Ions and Molecules) 2021**, Caparica, Portugal : 1^{er}-4 Novembre 2021 – Communication orale
Ophélie Germande, Isabelle Baudrimont and Magalie Baudrimont. Release of NiONPs from mining activity in New Caledonia: cytotoxicity and mitochondrial disruption on eel hepatocytes HEPA-E1.

- **Séminaire à l'Université de Nouméa**, Nouvelle-Calédonie : 09 juillet 2021 – Communication orale
Ophélie Germande. Impact environnemental et sanitaire des particules de nickel émises par les activités minières en Nouvelle Calédonie.

- **EuroTox 2021** : 26 Septembre-1^{er} Novembre 2021 – Communication affichée
Ophélie Germande, Isabelle Baudrimont and Magalie Baudrimont. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in NiONPs – induced toxic effects on eel hepatocytes and endothelial cells.

- **SETAC 2021** : 03-06 Mai 2021 – Communication orale
Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Christelle Guibert, Isabelle Baudrimont and Magalie Baudrimont. Involvement of calcium signaling and mitochondria alteration in nickel oxide nanoparticles - induced alterations in human pulmonary artery endothelial cells.

- **NanoTox 2021** : 20-23 Avril 2021 – Communication affichée
Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Christelle Guibert, Magalie Baudrimont and Isabelle Baudrimont. Involvement of oxidative stress and TRPV4 channel disruption in nickel oxide nanoparticles - induced calcium homeostasis alterations in human pulmonary artery endothelial cells.

2020 :

- **NanoSafe 2020** : 11-16 Novembre 2020 – Communication affichée

Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Roger Marthan, Magalie Baudrimont, Christelle Guibert and Isabelle Baudrimont. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in oxide nickel nanoparticles - induced alterations in human pulmonary artery endothelial cells.

- **Paris RedOx 2020** : 08-09 Octobre 2020 – Communication orale

Ophélie Germande, Juliette Deweirdt, Fabien Beaufils, Jean-François Quignard, Magalie Baudrimont, Christelle Guibert and Isabelle Baudrimont. Role of oxidative stress on inflammatory response, calcium signaling and apoptose induced by nickel oxide nanoparticles on endothelial cells.

FORMATIONS

Catégorie : 1. Connaitre l'environnement académique

Participation à la journée du département STS, Université de Bordeaux

Catégorie : 2. Mener à bien ses activités de recherche

- Comprendre les nanosciences (MOOC), Université Paris Saclay (formation en ligne) : 10 heures
- Encadrement stage de Master 2 : 12 heures
- Éthique de la recherche (MOOC), Université de Lyon (formation en ligne) : 12 heures
- Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (MOOC), Université de Bordeaux (formation en ligne) : 15 heures
- Présentation des travaux de recherches lors d'un séminaire à Nouméa, Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA), Université de Nouméa, Nouvelle-Calédonie

Catégorie : 3. Communiquer en langue étrangère

Communication orale à un congrès international : Paris Redox 2020, ISANH pour le congrès ParisRedOx2020, Paris : 15 heures

Catégorie : 4. Développer ses compétences relationnelles

Journée de rentrée ED SE 2020 - présentation des travaux : 3 heures

Catégorie : 5. Se former à l'enseignement

Pédagogie universitaire : 'Parcours A' troisième session- Réflexions sur les pratiques pédagogiques', à distance : 18 heures

Total participation : 85 heures / 9 modules

INTRODUCTION

De nos jours, les activités minières sont la seconde source de pollution des sols aux Éléments Traces Métalliques (ETM) dans le monde. Ce type de pollution peut s'avérer être un problème majeur de santé publique et environnementale sur des sols fragiles et instables. En effet, des sols sensibles à l'érosion naturelle et anthropique seraient responsables, d'une part, de l'émission atmosphérique de particules fines et ultrafines provenant des sols, et, d'autre part, de la pollution des cours d'eaux après lessivage de ces sols. La pollution atmosphérique et des eaux aux métaux peut être amplifiée dans les régions minières par les activités anthropiques et industrielles d'exploitation des minerais. Ces problématiques sont largement présentes en Nouvelle-Calédonie. En effet, en produisant un peu plus de 158 000 tonnes de nickel (Ni) par an, la Nouvelle-Calédonie fait partie des producteurs de Ni les plus importants au monde. Cette production massive de Ni fait ainsi émerger des problématiques sanitaires et environnementales. En effet, l'exploitation de ces mines à ciel ouvert de latérites nickélifères, entraîne l'émission de particules ultrafines d'oxyde de nickel (NiO) dans l'atmosphère. Ces particules pourront alors, d'une part, être inhalées par les travailleurs et les populations environnantes, mais également se retrouver par dépôt ou lessivage dans les cours d'eau douce.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la pollution atmosphérique cause chaque année la mort prématurée de 7 millions de personnes dans le monde. Ces décès font majoritairement suite à l'exacerbation ou au déclenchement de pathologies respiratoires et cardio-vasculaires après une exposition chronique aux polluants atmosphériques. En effet, les personnes souffrant d'une pathologie pulmonaire préexistante sont plus sujettes aux effets délétères de l'inhalation des polluants. La toxicité des polluants atmosphériques dépend de multiples paramètres tels que la composition physico-chimique de ces derniers ou encore leur taille. En effet, les polluants atmosphériques métalliques et de petites tailles, telles que les particules ultrafines (appelées nanoparticules, NPs, lorsqu'elles sont manufacturées) sont particulièrement toxiques, notamment à cause de leur potentiel cancérigène et de leur distribution dans l'appareil respiratoire, en contact direct avec les cellules pulmonaires. Il est aujourd'hui essentiel de connaître et comprendre les mécanismes de toxicité, au niveau cellulaire, de ces polluants, tels que les NPs de NiO émises par les activités minières, peu connus à l'heure actuelle afin d'apprécier le risque, pour les populations locales, de l'inhalation de ces polluants. De plus, il est intéressant

d'évaluer si une population possédant une pathologie cardio-vasculaire préexistante est plus sensible à la toxicité de ces NPs qu'une population saine.

Quant à la pollution des cours d'eau aux métaux, elle est responsable aujourd'hui du déclin, voire de la disparition, de plusieurs dizaines d'espèces aquatiques dans le monde. En effet, les espèces aquatiques vivant dans des eaux polluées peuvent directement ou indirectement accumuler les métaux, via la voie des métaux dissous dans l'eau notamment suite au lessivage des sols, ou bien via la consommation d'espèces polluées précédemment. Les métaux s'accumulant dans l'organisme des poissons peuvent ensuite déclencher différentes altérations morphologiques et physiologiques pouvant conduire à la mort des espèces. Les conséquences d'une pollution au Ni et autres métaux associés sur des poissons de fin de chaîne alimentaire sont aujourd'hui peu connues, notamment, en ce qui concerne les mécanismes de toxicité cellulaire au niveau du principal organe de détoxification des métaux, à savoir, le foie.

Cette Thèse de doctorat permet ainsi d'aborder deux problématiques axées autour d'un même phénomène : les exploitations minières de Ni en Nouvelle-Calédonie. En effet, grâce à une collaboration entre le Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux (CRCTB) unité INSERM U1045 et l'Unité Mixte de Recherche Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC) 5805, un axe de toxicologie humaine et un axe d'écotoxicologie ont été étudiés dans ce travail. Le but de cette Thèse était de comprendre quelles pourraient être les conséquences de l'exposition à des particules de Ni chez l'Homme et sur une espèce de poisson de fin de chaîne trophique. Ce travail s'inscrit ainsi dans le concept One Health (figure 1).

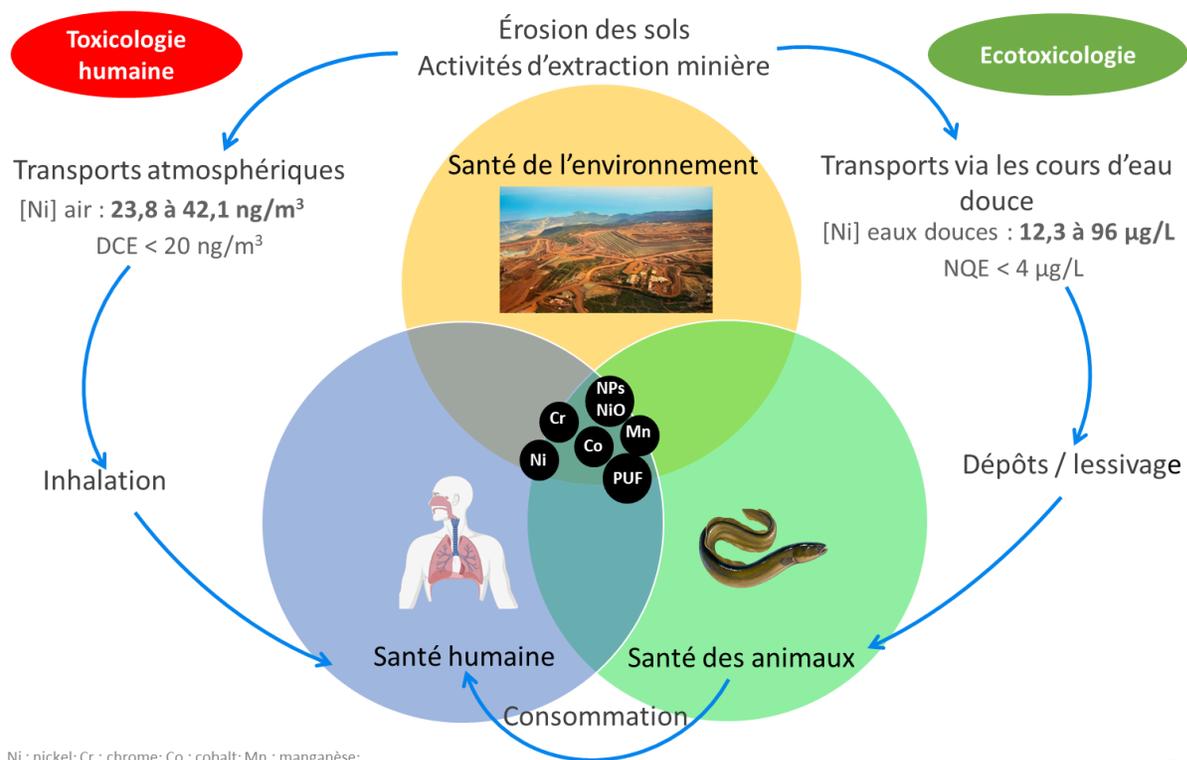


Figure 1 : Concept One Health appliqué au sujet de Thèse – Basées sur les normes Européennes

Le chapitre I de cette Thèse présentera un Etat de l'Art bibliographique sur la pollution atmosphérique et des cours d'eau aux métaux. Après avoir défini le contexte calédonien de notre sujet, nous présenterons les polluants métalliques dans l'air et l'eau ainsi que les réglementations qui s'appliquent aux métaux. Puis, dans une seconde partie, d'une part, nous présenterons les modèles biologiques humains et aquatiques que nous avons choisi d'utiliser dans notre projet afin d'élucider les mécanismes de toxicité des particules de NiO et de Ni et, d'autre part, nous montrerons en quoi ces modèles sont particulièrement pertinents. Enfin, nous aborderons dans une dernière partie en quoi les particules ultrafines et les NPs sont particulièrement toxiques et nous ferons une revue bibliographique de la toxicité des particules de Ni chez l'Homme, les rongeurs et les poissons de fin de chaîne trophique.

Les deux grands objectifs de la Thèse seront, ensuite, présentés.

Le chapitre II de la Thèse sera consacré à la présentation des matériels et méthodes utilisés pour répondre à nos objectifs.

Le chapitre III présentera les résultats obtenus sous forme d'articles publiés ou en cours de préparation, articulés autour des deux objectifs principaux. Nous présenterons en effet dans un

premier temps les résultats et articles répondant à notre objectif numéro 1 qui se base uniquement sur des études *in vitro* sur nos deux modèles biologiques humain et animal afin d'étudier les mécanismes de toxicité des NPs de NiO et des particules de latérites. Puis, nous présenterons les résultats de la partie plus fonctionnelle s'appuyant sur des études *in situ* et *in vitro* en condition de culture pathologique pour les cellules humaines ou à partir de prélèvements de poissons directement sur le terrain en Nouvelle Calédonie.

Pour finir, une conclusion générale sera présentée ainsi que les perspectives envisageables à la suite de ce travail, à la fois en toxicologie humaine et en écotoxicologie.

ETAT DE L'ART

Partie 1 : Contexte géologique et activités minières en Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie, également appelée Grande Terre, est née d'un détachement de la plaque australienne suite à deux phénomènes géologiques majeurs de subduction puis d'obduction ayant eu lieu il y a 34 millions d'années (Neall and Trewick, 2008). L'obduction a provoqué une remontée du manteau terrestre à la surface, notamment d'une nappe d'ophiolites ultramafiques (Pelletier, 2007), c'est-à-dire de fragments d'anciennes lithosphères océaniques charriées sur la croûte continentale, composées de roches ultramafiques telles que les péridotites. La latérisation tropicale de cette nappe, c'est-à-dire la décomposition des roches de surface riches en silicates et fer (Fe), a ainsi été à l'origine de l'importante présence de latérites nickélifères sur l'île, au-dessus des péridotites (figure 2).

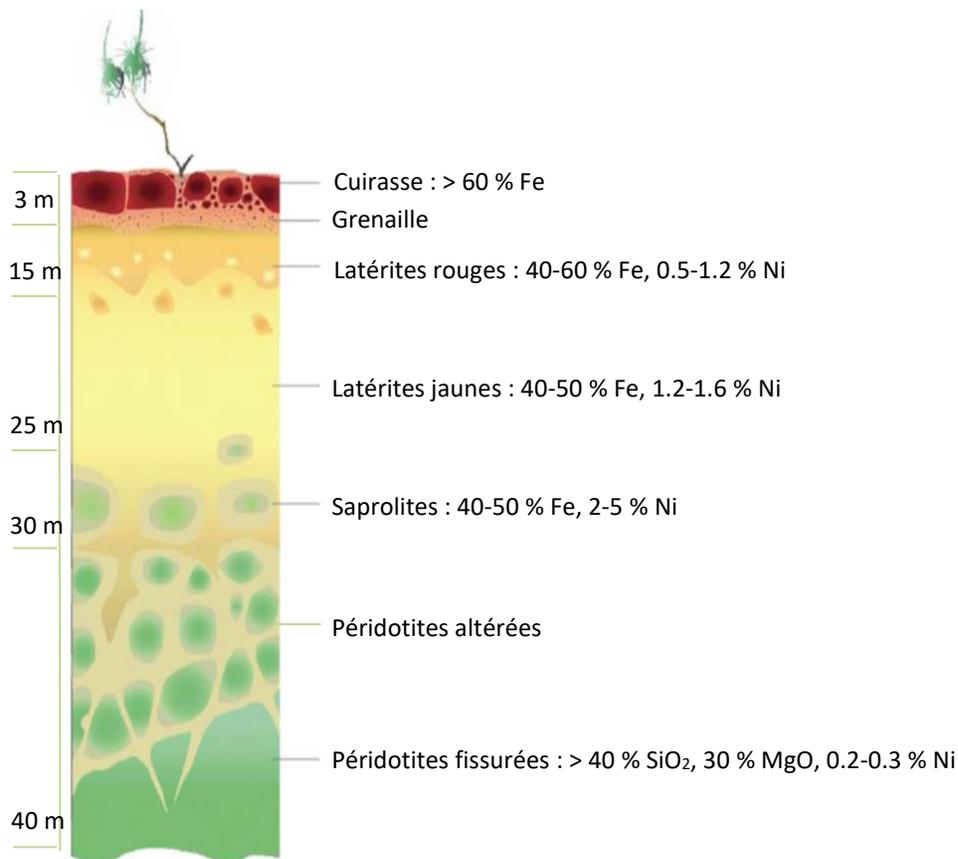


Figure 2 : Profil d'altération sur péridotites. Adapté de « Pelletier les minerais de nickel de Nouvelle-Calédonie, bulletin de l'union française des géologues » 2003

La latérite est une roche rouge formée par l'altération des roches sous les climats tropicaux, comme en Nouvelle-Calédonie, particulièrement riche en minerais oxydés, tels que les oxydes de Fe et de nickel (Ni).

Les ressources en Ni se concentrent au sein de ces formations ultramafiques recouvrant près de 30 % des sous-sols calédoniens, soit environ 5 000 km² (figure 3).



Source : Carte des activités industrielles et de services de Nouvelle-Calédonie, éditions Hatier, Paris, 1990.

Figure 3 : La Nouvelle-Calédonie, France, Outre-Mer : la Nouvelle-Calédonie et les sites miniers. Carte des activités industrielles et de services de Nouvelle-Calédonie, édition Hatier 1990.

Ces formations sont constituées de roches ultrabasiques particulièrement riches en éléments traces métalliques (ETM) tels que le manganèse, Mn ; le chrome, Cr ; le cobalt, Co et le Ni, et pauvres en nutriments essentiels pour les plantes comme le phosphate, P ; le potassium, K ou encore l'azote, N (Losfeld et al., 2015). Aujourd'hui, la Nouvelle-Calédonie constitue la 3^{ème} ressource de Ni dans le monde, avec près de 25 % des ressources mondiales, sous forme de minerais oxydés (Isnard et al., 2016, USGS, 2022).

C'est en 1864, que Jules Garnier, ingénieur, découvre une roche verte inconnue près de la rivière de Dumbéa. Il s'agit alors d'un silicate de Ni-Mn contenant environ 15 % de Ni, roche qui par la suite a été nommée Garnierite (Losfeld et al., 2015). C'est ensuite en 1873 qu'ont lieu les premières exploitations de Ni au Mont-Dore, puis, la Société Le Nickel (SLN) est fondée en 1877 avec la création de la première fonderie de Ni de l'Île à Nouméa. La SLN restera jusqu'en 1905 le plus grand producteur de Ni au monde, devancé par la suite par le Canada (L'Huillier, 2010). L'industrie du Ni est alors en plein essor et ne s'arrête pas de croître jusqu'à avoir besoin de mains d'œuvre en renfort pour les exploitations, faisant venir des ouvriers de Polynésie, d'Asie ou encore d'Europe. Dans les années 1960, la Nouvelle-Calédonie est à son apogée due à l'explosion de la demande mondiale en Ni. En 6 ans, entre 1965 et 1971, la production de Ni sur le territoire passe de 2.5 à 7.7 millions de tonnes, sans se soucier des conséquences environnementales, jusqu'en 1975 où le cours du Ni s'effondre. Cependant, depuis les années 1990, la demande mondiale ne cesse à nouveau de croître (figure 4).

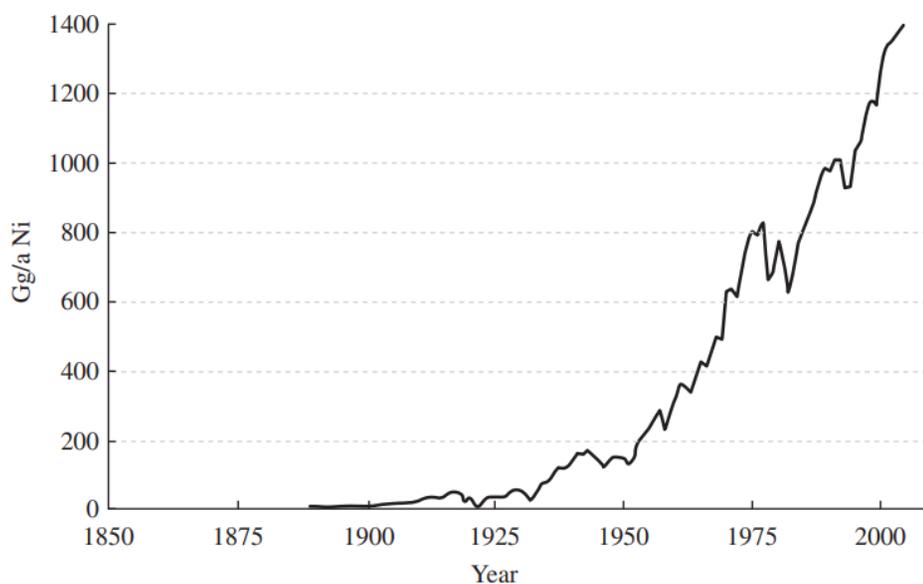


Figure 4 : Production mondiale de nickel au cours des 150 dernières années en gigagrammes de Ni par an (Gg/an Ni) d'après Reck et al., 2008

Le Ni est aujourd'hui encore le métal le plus exploité en Nouvelle-Calédonie, loin devant le Co et le Cr, plaçant le territoire au 4^{ème} rang mondial de production de Ni, après la Russie, les Philippines et l'Indonésie (USGS, 2022). Le Ni est utilisé dans de nombreux domaines de l'industrie, tels qu'en aéronautique et dans le bâtiment, secteurs utilisant des alliages en Ni, ou encore pour la

fabrication de batteries, notamment, pour les voitures électriques utilisant des batteries en Ni-Cd, secteur en plein essor depuis les années 2000. Sa propriété de métal inoxydable après traitement en fait un composant très intéressant pour les industriels.

En Nouvelle-Calédonie, tout comme en Indonésie, en Australie, à Cuba, ou encore en Amérique du Sud, le Ni se trouve sous forme de minerais oxydés. Les minerais oxydés s'exploitent dans des carrières à ciel ouvert contrairement aux minerais sulfurés. L'extraction du Ni sur la Grande Terre se fait alors dans des mines à ciel ouvert selon un procédé chimique hydro-métallurgique sous haute pression et haute température en attaquant la roche avec de l'ammoniaque ou de l'acide sulfurique ou, par pyrométallurgie qui vise l'obtention de métaux pur à partir de leurs minerais au moyen de techniques utilisant le feu. Une fois extraite, la poudre du minerai riche en Ni peut s'oxyder au contact de l'air pour se retrouver sous forme d'oxydes de nickel (NiO). Le NiO se retrouve, dans l'environnement, majoritairement à l'état redox NiO(+II) (Yokel et al., 2006). Ces activités minières sont ainsi responsables d'une émission de particules de NiO et de Ni directement dans les mines mais également de nanoparticules (NPs) de NiO et de Ni émises par les usines de traitement et de raffineries. En effet, deux nouvelles usines de transformation de Ni de classe mondiale sont entrées en activité en 2010 (Goro Nickel dans le Sud) et 2014 (Koniambo, dans le Nord) ; en plus de l'usine de la SLN à Nouméa déjà existante. En représentant 8 à 17 % du PIB annuel, la production de Ni est en enjeu économique majeur pour le territoire, au détriment d'impacts potentiels sur la santé humaine et sur l'environnement. Les activités minières représentent d'ailleurs de nos jours la deuxième source de contamination des sols par les métaux dans le monde (Singh et al., 2005).

Des études réalisées en Nouvelle-Calédonie depuis quelques années ont commencé à mettre en évidence l'impact négatif sur l'environnement et sur la population humaine des exploitations minières. Au niveau environnemental, la Nouvelle-Calédonie se caractérise par la richesse de sa faune et de sa flore avec près de 80 % des espèces végétales qui sont endémiques. Les exploitations minières ont décapé des hectares de forêts et de savane, mais ce n'est qu'à partir des années 1970 que la population s'est intéressée à ces dégradations. À ce jour, il a été montré une modification de la génétique de certains végétaux, tels que les conifères, en lien direct avec la dégradation de l'environnement par l'Homme également à cause des activités agricoles (Kettle et al., 2007) car les forêts ne couvrant plus que 2 % de leur surface d'origine (Bouchet et al., 1995). Les trois principales sociétés minières du pays essayent d'ailleurs aujourd'hui de participer à la

revégétalisation pour reconstituer les paysages de l'ère « d'avant nickel ». En plus des forêts, les écosystèmes agricoles et aquatiques des rivières sont également fortement dégradés et contaminés par les métaux (Gunkel-Grillon et al., 2014, Hedouin et al., 2007, Bonnet et al., 2014). Aujourd'hui, les anciennes exploitations minières abandonnées sont également responsables d'une importante pollution des eaux et de l'air. Le lagon calédonien étant un des derniers espaces tropicaux côtiers considéré en bon état de santé. La conservation et la protection de l'environnement de l'île est donc un défi important. Au niveau sanitaire, peu de données existent sur les risques et conséquences d'une contamination au Ni par les particules atmosphériques émises ou par des sources d'origine alimentaire. Cependant, des dosages de Ni dans les urines de la population faits en 2016 ont révélé une imprégnation importante des calédoniens au Ni, notamment pour les populations vivant dans des zones ultramaïfiques sans mine, ce qui laisse supposer d'autres facteurs d'altération des sols (St-Jean et al., 2018).

La contamination de la faune, de la flore et de la population se fait principalement via l'émission de particules de Ni et de NiO. En effet, les sols miniers sont sujets à l'érosion, d'une part, d'origine anthropique par les activités minières à ciel ouvert et, d'autre part, d'origine naturelle ce qui représente une fraction non négligeable. Tout d'abord l'érosion éolienne, issue de l'altération des roches par le vent, puis l'érosion mécanique due aux forces physiques (pluies) arrachant et abimant les roches, sont des phénomènes naturels qui accroissent l'émission dans l'atmosphère de particules provenant des roches latéritiques. Tous ces phénomènes sont responsables d'une augmentation significative des émissions atmosphériques d'ETM, notamment de particules de Ni (Derbyshire, 2007, Pasquet et al., 2016a). Les activités minières diminuent ainsi la qualité de l'air ambiant et augmentent, d'une façon directe, l'exposition, notamment via l'inhalation, des travailleurs ainsi que des populations environnantes, aux particules riches en Ni. De plus, ces particules peuvent se retrouver dans l'écosystème aquatique, en particulier dans les cours d'eau douce proches des mines, par dépôt ou lessivage en aval des gisements de latérites nickélifères, jusqu'au lagon. Les métaux sont en effet lessivés sur les sols miniers, qui, ayant une faible capacité de rétention de l'eau, laissent ces métaux ruisseler sur les sols et se retrouver dans les cours d'eau douce. Le transport des métaux dans les eaux de surface et le lessivage favorisent ainsi une contamination des cours d'eau (Ashraf et al., 2011b, Ashraf et al., 2011a). Les organismes

aquatiques vivant en aval des mines sont donc potentiellement impactés par la pollution des eaux riches en ETM (figure 5).

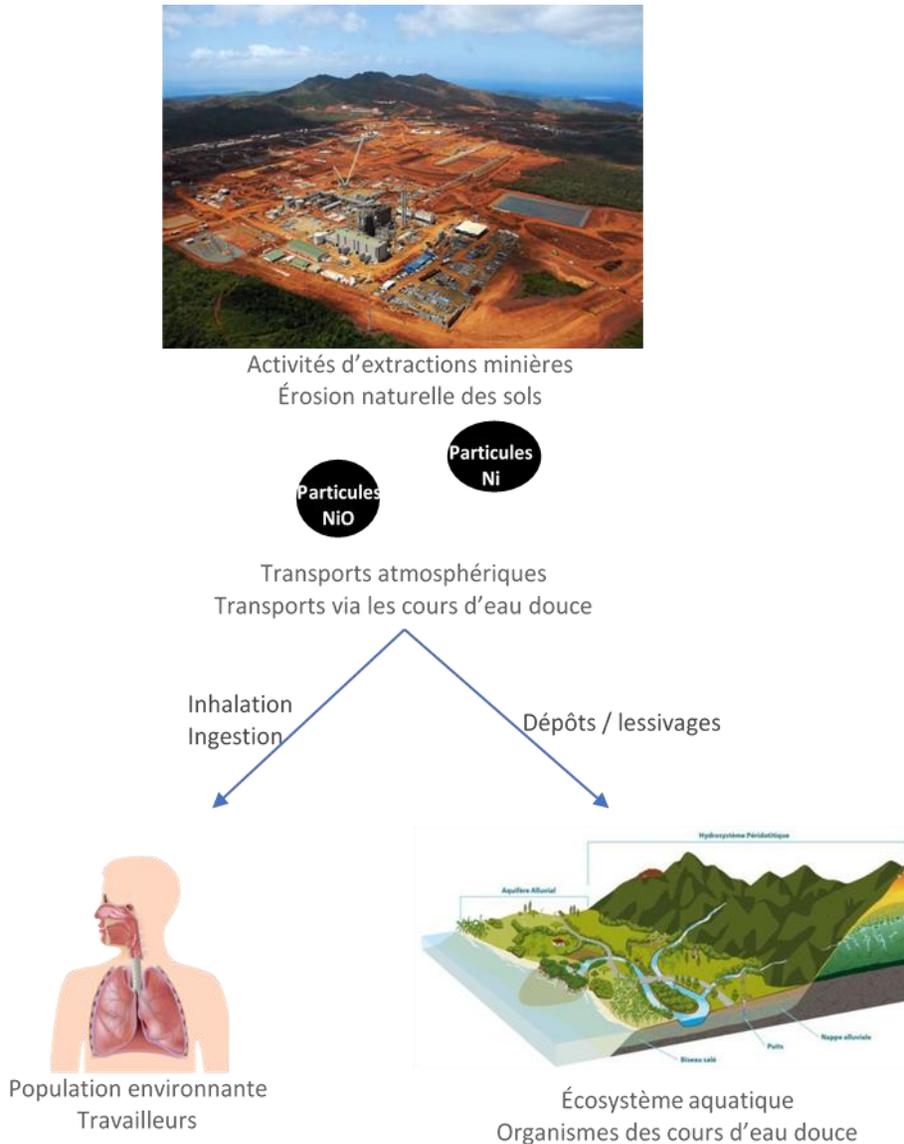


Figure 5 : Chantier de construction de l'usine Métallurgique de PRNC sur des latérites nickélicifères en Nouvelle-Calédonie, émission de particules ultrafines de NiO et de Ni. Les NPs peuvent être inhalées par les travailleurs et les populations environnantes, et se retrouver par dépôts ou lessivage dans les cours d'eau douce.

Quelles sont alors les conséquences d'une telle exposition chez l'Homme et sur les écosystèmes aquatiques ? Aujourd'hui il existe peu de données qui permettent de répondre à cette problématique. Dans cette Thèse nous allons ainsi nous concentrer sur les conséquences d'une exposition aux particules de NiO, et plus particulièrement aux NPs de NiO, à la fois sur des cellules vasculaires pulmonaires, cibles des particules inhalées par l'Homme ; mais également sur un organisme aquatique carnivore de fin de chaîne trophique.

Partie 2 : La pollution

Le contrôle de la pollution de l'air ambiant et des eaux est un enjeu majeur pour assurer une qualité satisfaisante à la fois de l'air que nous respirons, mais également des eaux, réservoirs naturels de multiples organismes aquatiques et végétaux.

1. La pollution atmosphérique

1.1. Définition

La qualité de l'air que nous respirons dépend directement des polluants atmosphériques présents dans l'atmosphère. En 2017, nous estimions à 7 millions le nombre de décès prématurés dans le monde dû à la pollution de l'air (Miller et al., 2017). En France, la pollution atmosphérique serait responsable de 40 000 décès par an d'après une étude réalisée entre 2016 et 2019 par Santé Publique France (SPF), devant l'alcool et les accidents de la route (SantéPubliqueFrance) et en 2022, 90 % de la population mondiale respirerait un air trop pollué selon l'OMS. La définition française de la pollution atmosphérique date de 1996 avec la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Énergie. Il est ainsi indiqué que la pollution atmosphérique constitue « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». De plus, cette Loi reconnaît « à chacun le droit de respirer un air qui ne nuise pas à sa santé », avec des actions « visant à prévenir, à surveiller, à réduire ou à supprimer les pollutions atmosphériques, à préserver la qualité de l'air et, à ces fins, à économiser et à utiliser rationnellement l'énergie » (Legifrance, 1996).

La prise de conscience des risques dus à une forte pollution atmosphérique date de 1952, lors de l'épisode du smog (la grande fumée) à Londres, au Royaume-Uni. Il s'agissait d'un épais nuage de fumée composé essentiellement de particules fines et d'ozone qui recouvra la ville durant 4 jours. Les premières estimations de 1953 faisaient état de 3 000 morts (Logan, 1953) mais des études plus récentes montrent que cet épisode de pollution aurait causé près de 12 000 décès suite à des infections respiratoires (Bell and Davis, 2001).

1.2. Les différents types de polluants atmosphériques

Les particules atmosphériques regroupent différents polluants, solides et/ou liquides en suspension dans un milieu gazeux. Il existe deux grandes familles de polluants atmosphériques : les polluants primaires et les polluants secondaires.

1.2.1. Polluants atmosphériques primaires

Il s'agit de polluants émis directement dans l'atmosphère, provenant de sources de pollution anthropiques ou naturelles telles que le chauffage, le trafic routier aérien ou maritime, l'agriculture ou encore les industries, notamment minières. Il en existe 7 catégories distinctes.

Les oxydes de carbone (COx) : Le plus répandu étant le monoxyde de carbone (CO) qui provient principalement des gaz d'échappement des véhicules. Le CO a un impact négatif sur l'environnement en étant précurseur de l'ozone troposphérique et en participant à l'effet de serre suite à une transformation en gaz carbonique CO₂. Le CO est également un polluant de l'air intérieur majeur, en effet, chaque année, un nombre non négligeable d'intoxications chez l'Homme au CO sont rapportées, pouvant conduire jusqu'au décès, notamment à cause d'une mauvaise installation des chauffages domestiques.

Les oxydes de soufre (SxOy) : Ils proviennent de combustibles fossiles contenant du soufre et du chauffage résidentiel essentiellement, mais ont également une origine naturelle notamment à la suite d'éruptions volcaniques. Ces composés sont responsables des pluies acides via la formation de polluants secondaires tel que l'acide sulfurique H₂SO₄, dégradant les végétaux, les écosystèmes aquatiques et forestiers et les sols. Chez l'Homme, l'inhalation des oxydes de soufre peut entraîner, en particulier, une irritation des muqueuses respiratoires.

Les oxydes d'azote (NOx) : Provenant essentiellement de processus de combustion à hautes températures de combustibles fossiles, ils peuvent être rejetés par les gaz d'échappement des véhicules. Tout comme les oxydes de carbone, ils participent à l'effet de serre, comme les SxOy, et au phénomène des pluies acides via la formation de polluants secondaires tels que l'acide nitrique HNO₃. Ce sont des gaz irritants pour les bronches, déclenchant notamment une hyperréactivité bronchique.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : Ils sont produits suite à une combustion incomplète ou suite à l'utilisation de solvants ou dégraissants (produits ménagers). Les HAP sont irritants pour l'Homme étant à l'origine d'une diminution de la capacité respiratoire et de nuisances olfactives. Certains HAP sont d'ailleurs considérés comme cancérogènes, tels que le benzopyrène ou encore le naphthalène, classés respectivement classe 1B et 2B par le Centre International de la Recherche sur le Cancer (CIRC).

Les composés organiques volatiles (COV) : Tout comme les HAP, les COV sont émis suite à une combustion incomplète, principalement dus à des activités anthropiques dans trois secteurs en particulier (secteur tertiaire 46%, industrie manufacturière 36%, et les transports 8%). Les COV peuvent provoquer des irritations de la muqueuse respiratoire, des douleurs respiratoires et déclencher un asthme. Les COV sont également reconnus comme mutagènes et cancérogènes (benzène, perchloroéthylène...). En réagissant avec d'autres polluants de l'atmosphère, ils sont précurseurs de particules secondaires. Les COV participent à l'effet de serre additionnel et constituent des gaz à effets de serre (GES).

Les métaux et métalloïdes : Parmi les ETM nous retrouvons le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd) mais également le Ni, métal auquel nous nous intéressons particulièrement dans cette Thèse, et parmi les métalloïdes l'arsenic (As). Les ETM ont de très nombreuses origines, naturelles (érosion des sols, feux de forêts, éruption volcanique) ou anthropiques dues aux activités industrielles (extraction minière comme en Nouvelle-Calédonie, aciérie, incinération de déchets...). Les métaux ont un rôle important dans la contamination des sols et des aliments qui peuvent être contaminés soit directement par la présence de métaux dans les sols ou bien par les lessivages ou les retombées de particules riches en métal. Ces polluants sont également connus comme pouvant s'accumuler dans les organismes vivants perturbant ainsi leur physiologie ce qui sera détaillé plus tard (paragraphe 2.3.2). Les métaux peuvent être inhalés, ou, ingérés par l'Homme après consommation d'aliments contaminés. Ces expositions peuvent à l'origine d'effets délétères sur les voies respiratoires, le système nerveux, le système hépatique ou encore sur les fonctions rénales. Certains de ces métaux ou métalloïdes sont par ailleurs classés cancérogènes (Cd et As groupe 1 ; Ni groupe 2B) selon le CIRC.

Polluants particulaires : Ce type de polluant sera détaillé dans le paragraphe 1.2.3.

1.2.2. Polluants atmosphériques secondaires

Il s'agit de polluants issus de modifications physico-chimiques de différents polluants atmosphériques.

L'ozone (O_3) : Provient par exemple de la transformation photochimique complexe entre certains polluants comme les NO_x , le CO et les COV. C'est un gaz irritant, notamment, pour les muqueuses respiratoires et oculaires.

L'ammoniac (NH_3) : Provient principalement des activités agricoles avec la volatilisation lors des épandages d'engrais. C'est un gaz irritant qui participe également aux pluies acides.

Les nitrites (NO_2^-) : Émis lors de processus de combustion à partir d'oxydes d'azote et de peroxydes d'azote. Produits en excès, ils contribuent aux phénomènes des pluies acides.

Les différentes origines des polluants atmosphériques sont résumées dans la figure 6.

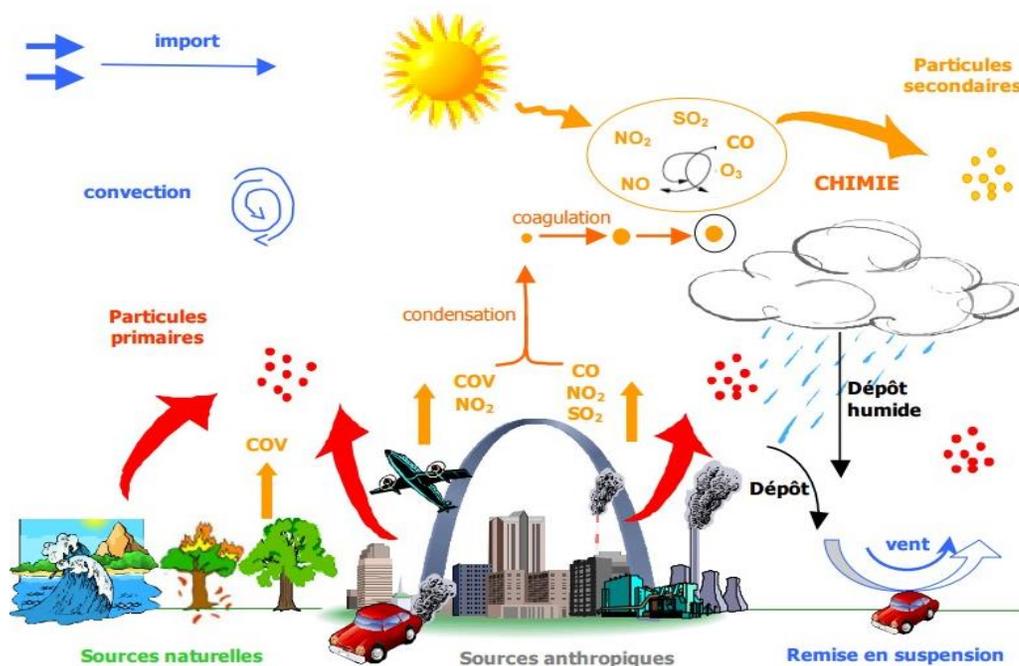


Figure 6 : Schéma des principales sources de polluants atmosphériques. D'après « Synthèse sur les particules atmosphériques », rapport d'Airparif – Rapport avril 2021. AirParif

1.2.3. Polluants atmosphériques particulaires

Les particules atmosphériques sont composées de particules solides microscopiques, les « Particulate Matter » (PM), et de gouttelettes liquides en suspension dans l'air. Il s'agit de polluants primaires et secondaires dus aux processus de nucléation possible dans l'atmosphère à partir de composés dissous qui donneront ensuite des polluants secondaires. Les particules atmosphériques sont des mélanges hétérogènes qui ont des compositions et des caractéristiques physico-chimiques différentes à l'origine de nombreux effets toxiques qui diffèrent selon leur taille et leur composition que ce soit pour l'environnement ou l'Homme. Elles peuvent avoir plusieurs origines, d'une part, le rejet direct dans l'atmosphère de particules provenant des activités industrielles, domestiques ou de transport, et, d'autre part, la remise en suspension de particules déposées sur le sol avec les vents ou bien la transformation chimique des gaz. Les PM sont notamment et essentiellement responsables d'une toxicité respiratoire et cardio-vasculaire. Les PM peuvent être classées selon leur diamètre aérodynamique moyen (d_{am}). Ce dernier est défini comme étant le diamètre de la particule sphérique d'une masse volumique de $1\ 000\text{ kg/m}^3$ ayant la même vitesse limite de chute dans l'air que la particule (CNRS). On distingue quatre classes granulométriques (figure 7), toutes regroupées sous le terme de PTS, particules totales en suspension (AIRPARIF, 2010).

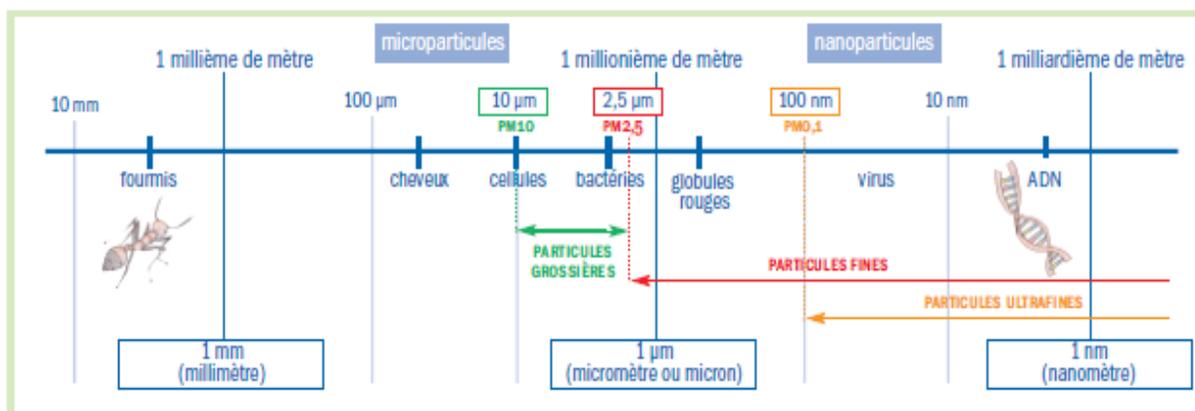


Figure 7 : Ordre de grandeurs des particules atmosphériques dont les nanoparticules par rapport à d'autres systèmes. La nano-échelle se situe entre la taille d'un virus et des rayons de l'ADN. D'après AirParif – Rapport 2019.

Les $PM_{\geq 10}$ (particules grossières) : Particules avec un d_{am} supérieur à $10\ \mu\text{m}$.

Les PM₁₀ (grosses particules) : Particules ayant un d_{am} inférieur à 10 μm . Ce sont des particules qui sédimentent rapidement et qui sont couramment contrôlées par les organismes de la surveillance de la qualité de l'air comme AirParif à Paris ou Scal'Air (Association de Surveillance Calédonienne de la Qualité de l'Air) en Nouvelle-Calédonie. Elles sont souvent retrouvées dans l'appareil respiratoire supérieur (fosse nasale) et se déposent par interception avec la surface biologique qu'elles vont rencontrer. Ces PM provoquent surtout des irritations locales et des brûlures (D, 2005).

Les PM_{2.5} (particules fines) : Particules ayant un d_{am} inférieur à 2.5 μm . Ces particules sédimentent moins rapidement et sont plus nocives pour la santé que les PM₁₀ notamment à cause de leur taille, leur permettant de pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire, atteignant les bronches et les alvéoles. Leur concentration dans l'atmosphère constitue un enjeu majeur de santé publique. Elles sont, notamment, responsables de symptômes respiratoires comme la toux, un essoufflement et des expectorations, puis à plus long terme de crise d'asthme ou de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), mais également de symptômes et pathologies cardiovasculaires telle que l'hypertension artérielle.

Les PM_{0.1} (particules ultrafines, PUF) : Particules dont la taille dans les trois dimensions de l'espace ne dépasse pas 100 nm. Nous parlons ainsi de nanoparticules (NPs) lorsque les particules ultrafines sont d'origine manufacturée. En raison de leur petite taille, les PUF peuvent être transportées au grès des vents sur plusieurs centaines de kilomètres avant de se retrouver par dépôt sur les écosystèmes. Les PUF proviennent de différentes sources d'émission, il peut s'agir de PUF d'origine anthropique non intentionnelle (émissions Diesel, combustion d'origine fossile, usure des pneus, plaquettes freins, procédés d'incinérations...), ou intentionnelle (NPs manufacturées utilisées dans le domaine médical, cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, industriel...), ou bien, d'origine naturelle (incendies, éruptions volcaniques ...) (Pascal Andujar, 2008). La nature chimique des PUF diffère selon leurs origines. En Nouvelle-Calédonie des PUF de NiO et de Ni provenant de l'extraction minière à partir de roches magmatiques peuvent être émises dans l'atmosphère. Les PUF de NiO et de Ni ont donc à la fois une origine naturelle, via l'érosion naturelle des sols calédoniens, et anthropique, via les activités humaines d'extraction des minerais.

Après inhalation, les particules atmosphériques pénètrent dans les voies respiratoires et sont transportées plus ou moins profondément dans les poumons (Saieg et al., 2011, Horemans et al., 2012). L'appareil respiratoire constitue donc une cible privilégiée des particules inhalées. Les particules les plus grosses ($> 1 \mu\text{m}$) vont plutôt rester piégées au niveau du pharynx et du larynx où elles peuvent être expectorées. Les particules de tailles intermédiaires ($< 0,1 \mu\text{m}$) peuvent se déposer tout le long de l'arbre trachéo-bronchique. Enfin, les nanoparticules les plus fines ($< 0,01 \mu\text{m}$) peuvent se déposer jusqu'aux alvéoles pulmonaires, franchir la barrière alvéolo-capillaire et se retrouver dans la circulation générale d'où elles peuvent atteindre différents tissus et organes. En effet, de nombreuses études *in vivo*, ont montré un passage rapide des particules les plus fines, ainsi que de leurs constituants solubles, dans la circulation systémique, ce qui pourrait entraîner des effets délétères par interaction directe avec le système cardiovasculaire, notamment avec les cellules endothéliales (CE) qui tapissent la lumière des vaisseaux (Miller et al., 2017, Nemmar et al., 2013).

Les PUF et NPs peuvent se déposer par différents mécanismes dans l'appareil respiratoire. Le plus souvent, deux mécanismes se distinguent : la sédimentation et la diffusion brownienne. La sédimentation a lieu surtout au niveau des voies respiratoires supérieures pour les PM avec un $d_{am} > 0.5 \mu\text{m}$ où elles sédimenteront relativement vite mais cette vitesse diminue petit à petit le long de l'appareil respiratoire. La diffusion brownienne, quant à elle, a lieu principalement au niveau des bronchioles et des alvéoles dans l'appareil respiratoire inférieur. Il s'agit d'un mouvement aléatoire des particules qui concernent les PM les plus petites donc avec un $d_{am} < 0.5 \mu\text{m}$ (Chen et al., 2006).

Le dépôt des PM dépend bien sûr de leur d_{am} mais également de leur composition physico-chimique, de la structure des voies respiratoires, de l'état du patient et des conditions météorologiques (humidité, sécheresse...) au moment de l'inhalation (Schmid et al., 2009). Plusieurs études ont tenté de prédire la déposition des PM en fonction de leurs tailles, comme présenté dans la figure 8.

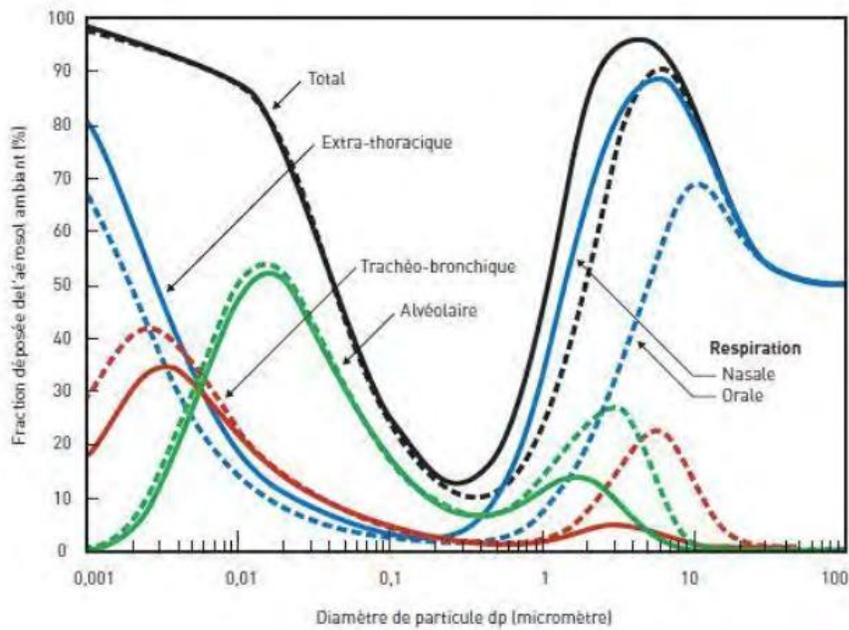
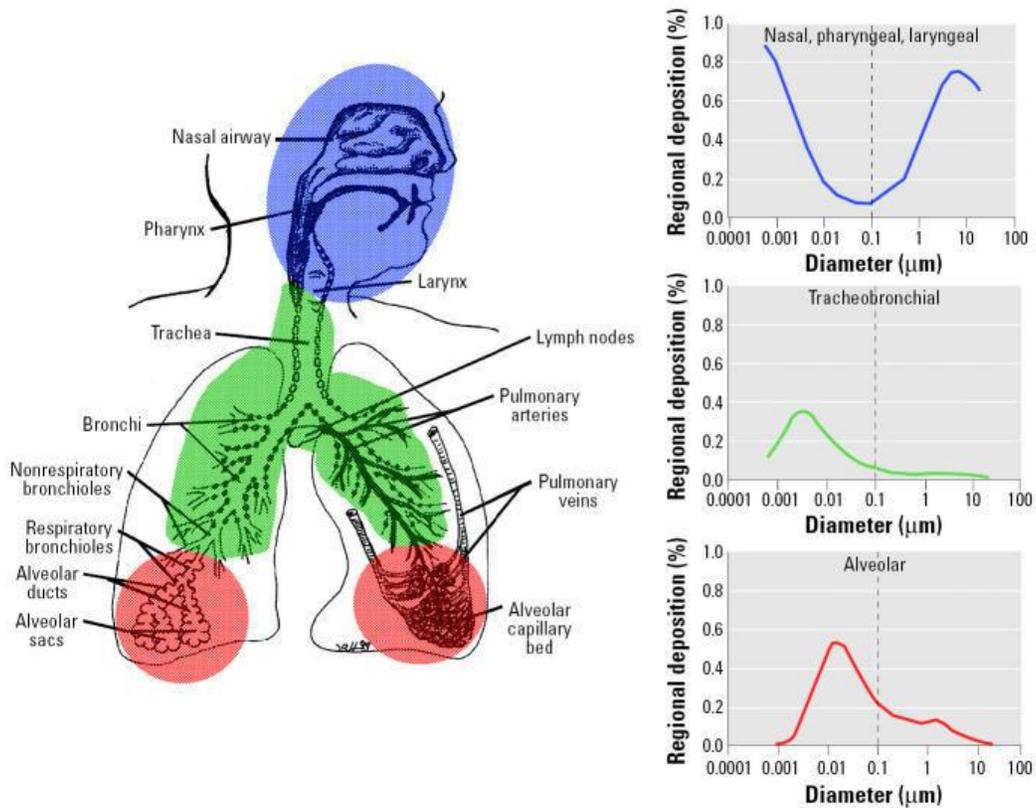


Figure 8 : Dépôt de particules inhalées selon la région anatomique. Les particules de diamètre aérodynamique moyen inférieur à 100 nm atteignent la région alvéolaire, contrairement au PM₁₀ piégées au niveau nasal. Oberdorster et al. 2005

1.3. Réglementation française

La mise en place de valeurs limites dans l'atmosphère des polluants date de 2010 avec le décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 correspondant à la directive 2008/50/CE de la Commission Européenne du 21 mai 2008 (Legifrance, 2010) (tableau 1). Ce décret fixe des normes, pour les polluants surveillés, tels que :

- L'objectif de qualité, à atteindre à long terme et maintenir sauf lorsque cela n'est pas réalisable
- La valeur cible, à atteindre dans un délai donné
- La valeur limite, à atteindre dans un délai donné et à ne pas dépasser, cette valeur est fixée sur la base de connaissances scientifiques
- Le seuil d'information et de recommandation, s'il est dépassé, un risque pour la santé humaine et pour les populations sensibles existe
- Le seuil d'alerte, s'il est dépassé, un risque pour l'ensemble de la population existe, justifiant l'intervention de mesures préfectorales d'urgence.

Tableau 1 : Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques. D'après le Décret 2010-1250 du Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie.

	Objectif qualité	Valeur cible	Valeur limite	Seuil d'info. & recommandation	Seuil d'alerte
NO ₂	40 µg/m ³ (an)		40 µg/m ³ 200 µg/m ³ (h) Max 18 fois/an	200 µg/m ³ (h)	400 µg/m ³ (h) Plus de 3 h 200 µg/m ³ (h) Sur 3 jours
O ₃	120 µg/m ³ (8h)	120 µg/m ³ (8h) Max 25 fois/an		180 µg/m ³ (h)	240 µg/m ³ (h)
SO ₂	50 µg/m ³ (an)		350 µg/m ³ Max 24 fois/an 125 µg/m ³ (jour) Max 3 fois/an	300 µg/m ³ (h)	500 µg/m ³ (h) Plus de 3h
CO			10 mg/m ³ (8h)		
C ₆ H ₆	2 µg/m ³ (an)		5 µg/m ³ (an)		
PM ₁₀	30 µg/m ³ (an)		40 µg/m ³ (an) 50 µg/m ³ (jour) Max 35 fois/an	50 µg/m ³ (h)	80 µg/m ³ (h)
PM _{2.5}	10 µg/m ³ (an)	20 µg/m ³ (an)	2012: 27 µg/m ³ (an) 2015: 25 µg/m ³ (an)		

Il existe ainsi aujourd'hui des organismes chargés de la surveillance de la qualité de l'air, tels qu'AirParif ou Scal'Air, qui effectuent des mesures quotidiennes des différents polluants classés comme « à surveiller » (polluants du tableau 1) et conseillent ensuite sur les mesures à mettre en place en cas de dépassement des seuils afin de limiter les pics de pollution. Par exemple, en cas de dépassement des seuils pour les PM_{10} et/ou les $PM_{2.5}$ relevés par les organismes de surveillance, des conseils sont donnés au préfet afin qu'il mette éventuellement en place des mesures permettant de limiter les pics de pollution en faisant appliquer des mesures préfectorales d'urgence. Parmi les mesures, un principe de circulation alternée peut être mis en œuvre afin de limiter les émissions de polluants des voitures les plus polluantes, ou bien la gratuité des transports en commun ou des stationnements. En revanche, tous les polluants ne sont pas surveillés, notamment les particules de tailles nanométriques.

1.4. Réglementation des particules de nickel dans l'atmosphère

En Nouvelle-Calédonie, la qualité atmosphérique est régulièrement contrôlée par Scal'Air. Trois polluants sont contrôlés en permanence dans l'atmosphère, les NO_x et le dioxyde de soufre (SO_2) provenant des processus de combustion et l' O_3 . En plus de ces derniers, la teneur en PM_{10} et $PM_{2.5}$ est étroitement surveillée. Scal'Air contrôle, également, lors de différentes campagnes, la teneur en poussières sédimentaires, en COV et en métaux, notamment en Ni. Il n'existe pas de réglementation locale en Nouvelle-Calédonie. C'est pourquoi, depuis 2007, l'organisme Scal'Air s'appuie sur les réglementations Européennes et Métropolitaines.

Pour les PM_{10} , la directive européenne 2008/50/CE du 21 mai 2008 donne une valeur limite pour la protection de la santé humaine de $40 \mu g/m^3$ en moyenne sur une année. Les prélèvements en Nouvelle-Calédonie donnent des valeurs comprises entre $13 \mu g/m^3$ et $18 \mu g/m^3$ depuis 2008. L'OMS recommande néanmoins de ne pas dépasser $15 \mu g/m^3$ en moyenne sur une année.

Pour les $PM_{2.5}$, l'Union Européenne donne une valeur limite de $10 \mu g/m^3$ en moyenne sur une année alors que l'OMS donne une valeur limite recommandée de $5 \mu g/m^3$. En Nouvelle-Calédonie, les valeurs sont comprises entre $4 \mu g/m^3$ et $6 \mu g/m^3$ depuis 2008.

En revanche, selon la Directive Européenne de 2004, revue en 2012, Directive 2004/107/CE, la valeur cible de Ni présent dans les PM_{10} devrait être inférieure à $20 ng/m^3$ (en moyenne sur une année). La valeur cible représente le niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère fixé dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé

humaine ou sur l'environnement, avec une valeur cible à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné. En France Métropolitaine, cette valeur varie de 1 à 10 ng/m³. En revanche, à Nouméa, des prélèvements annuels effectués par Scal'Air, donnent une valeur de Ni présent dans les PM₁₀ supérieure à la valeur cible. Les prélèvements effectués en 2018 varient de 23.8 à 42.1 ng/m³, soit plus de deux fois la limite supérieure de la Directive Européenne (figure 9). Même si nous pouvons noter une diminution des concentrations en Ni dans les PM₁₀ les deux dernières années, il faut, également, prendre en compte que 2020 n'est pas représentative d'une année classique aux vues des restrictions sanitaires ayant entraîné une nette baisse des activités minières et du fonctionnement des usines. Cependant, les dernières données de Scal'Air de 2021 montrent bien à nouveau une augmentation des concentrations de Ni dans les PM₁₀ à Nouméa, supérieures à 20 ng/m³. En Nouvelle-Calédonie, aucune étude épidémiologique sur l'exposition de la population par inhalation n'a été réalisée à ce jour. En revanche, l'imprégnation des populations aux métaux, toutes voies d'expositions confondues, notamment au Ni, a été mise en évidence lors d'une étude épidémiologique réalisée en 2018 qui sera détaillée dans la partie 3 (St Jean et al, 2018).

Face à ces chiffres alarmants et à l'importance de l'activité minière, un centre sur le nickel (CNRT-Nickel, Centre National de Recherche Technologique) dédié à l'étude de l'impact environnemental et sanitaire du nickel a été fondé en 2007 à Nouméa. Ce centre s'intéresse aussi bien au développement de l'industrie métallurgique et minière, qu'aux retombées sociétales du Ni et ses effets sur la santé et l'environnement. En effet, l'émission de ces particules en concentrations supérieures aux réglementations pourrait avoir des effets néfastes sur la santé humaine et sur les différents écosystèmes.

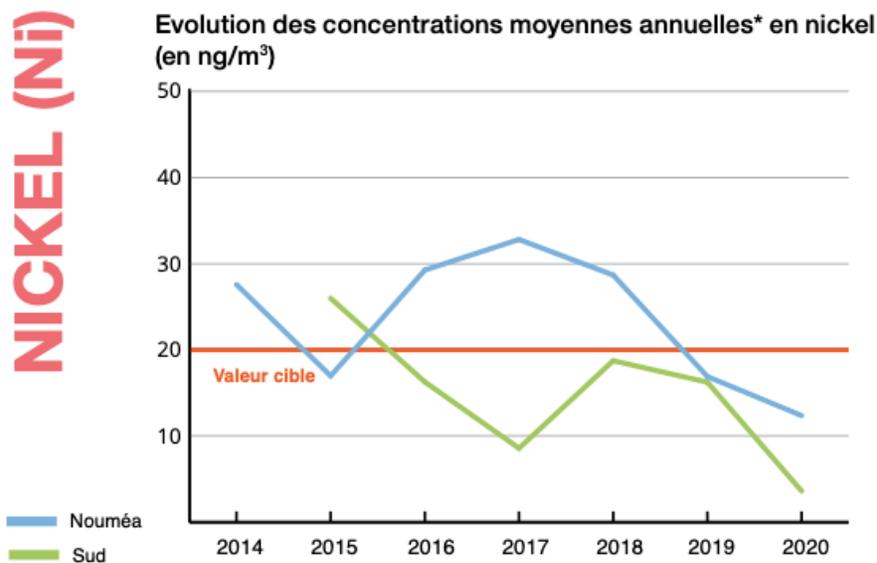


Figure 9 : Evolution des concentrations moyennes annuelles en nickel (ng/m³) selon Scal-Air – Rapport annuel 2020.

*pour le réseau de Nouméa : moyenne des 4 stations fixes, sauf en 2017 calculée sans la station de l'anse vata. Les données de 2016 ont été obtenues par un équipement hors référence nationale puis recalculées par une formule d'équivalence.

Pour le réseau du sud : moyenne des 4 stations fixes en 2015, puis des stations de la base vie, et de la forêt nord de 2016 à 2020.

Parmi tous ces polluants atmosphériques, certains sont également retrouvés dans les cours d'eau douce par dépôts ou lessivages ce que nous allons voir dans le paragraphe suivant.

2. La pollution dans les cours d'eau douce

2.1. Définition

En ce qui concerne la pollution des eaux, un cours d'eau est considéré comme pollué lorsque la composition ou l'état des eaux sont directement ou indirectement modifiés, notamment du fait de l'activité de l'Homme. La pollution de l'eau se caractérise alors par une pollution biologique (présence de micro-organismes ou espèces invasives), une pollution physique (modifications de température, d'écoulement des eaux ou présence de radiations) ou bien une pollution chimique (d'origine industrielle, urbaine ou agricole). Toutes les ressources en eau peuvent être concernées par la pollution : les cours d'eau douce, les nappes d'eau souterraines, les eaux saumâtres, l'eau de pluie, la neige ou la glace polaire. Dans cette Thèse nous nous intéressons aux cours d'eau douce.

Les activités humaines sont à l'origine de l'émission et de la production de nombreux polluants qui seront soit émis dans l'atmosphère, comme décrit précédemment, soit évacués dans les eaux usées, soit répandus sur les sols pour se retrouver dans les cours d'eau, notamment par lessivage. La plupart de ces polluants rejoignent ainsi les milieux aquatiques et particulièrement les eaux de surface. Seules 44 % des eaux de surface en France affichaient un bon état écologique en 2015 selon le Ministère de l'Environnement. Cette altération peut ainsi avoir des conséquences, à la fois sur les eaux pour la consommation humaine et donc sur la santé, mais également sur les organismes aquatiques. En effet, certains polluants peuvent être cancérigènes pour l'Homme s'ils sont présents en trop grandes quantités dans les eaux à consommation humaine, comme l'As, certains ETM (Ni, Cd), les nitrites, les HAPs ou encore quelques pesticides (atrazine, chlordécone...). Les organismes aquatiques, quant à eux, peuvent être des réservoirs de certains polluants, notamment les polluants organiques dont les perturbateurs endocriniens et les ETM, et ainsi bioaccumuler ces derniers. La bioaccumulation de substances chez les poissons désigne leur capacité à absorber et à concentrer dans leur organisme entier, ou dans un organe cible, ces substances. L'ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center, 1996) définit la bioaccumulation comme « le résultat net de l'accumulation, la distribution et l'élimination d'une substance dans un organisme due à son exposition dans l'eau, la nourriture, les sédiments et l'air ». Cette bioaccumulation peut avoir des conséquences graves chez certaines espèces conduisant, d'une part, à une diminution de leur population et, d'autre part, à la consommation de poissons pollués à l'origine d'importants problèmes de santé. En effet, même si de nos jours les effets bénéfiques de la consommation de poissons, notamment, sur la prévention des maladies cardiovasculaires est reconnu (Kris-Etherton et al., 2002), cette consommation peut s'avérer néfaste si les seuils réglementaires de concentrations en polluants tels que les ETM sont dépassés pouvant ainsi induire des maladies cardiovasculaires, neurologiques ou encore métaboliques (Kroger and Laforce, 2016, Stratakis et al., 2020, Virtanen et al., 2007). La pollution des eaux en métaux est ainsi à la fois une problématique environnementale et sanitaire.

En Nouvelle-Calédonie, c'est le cumul de deux phénomènes qui est responsable de la pollution des rivières par les métaux. Le premier est l'érosion naturelle et anthropique des sols comme décrit dans la partie 1, permettant la remise en suspension des particules de latérites qui se déposeront ensuite par sédimentation dans les rivières proches des mines. Le second phénomène est le lessivage des sols qui joue un rôle majeur dans la contamination des eaux par les ETM, en

particulier suite à de forts épisodes de pluie entraînant ainsi les particules métalliques dans les rivières, comme montré sur la photo en figure 10, prise en Nouvelle-Calédonie après un fort épisode de pluie en avril 2011.

À la suite de ces phénomènes, des PUF et des NPs de Ni et de NiO se retrouveront donc par dépôt ou lessivage dans l'écosystème aquatique et impacteront directement les organismes vivants dans les cours d'eau douce situés à l'aval des activités minières.



Figure 10 : Augmentation de la turbidité de la rivière du village de Poro et à son embouchure après de fortes pluies en avril 2011 (132,5mm), photo de droite. Extrait du rapport final du projet CNRT-Ni « petits bassins versants miniers » Allenbach, 2015

2.2. Les différents types de polluants

Les activités humaines, qu'elles soient industrielles, urbaines ou agricoles produisent des quantités importantes de substances polluantes à l'origine de différents types de polluants. Nous retrouvons, ainsi, deux groupes de polluants classés selon leur taille : les macropolluants et les micropolluants.

2.2.1. Macropolluants

Les macropolluants sont, par définition, des molécules de grande taille, qui peuvent être présentes naturellement dans les eaux ou bien, apportées par l'activité humaine. Ces substances

ne présentent pas de danger pour l'écosystème aquatique ou l'eau potable à condition que leurs concentrations restent en dessous des seuils d'effet. Parmi les macropolluants, nous retrouvons par exemple les nitrites. Pour les macropolluants, nous parlerons de concentration en mg/L au contraire des micropolluants dosés en µg/L.

2.2.2. Micropolluants : les métaux

Définition

Les micropolluants sont des composés toxiques à de très faibles concentrations (µg/L). Ils contaminent l'eau soit par apport direct (ruissellement, érosion, lessivage) soit par apport indirect via la pluie (figure 11).

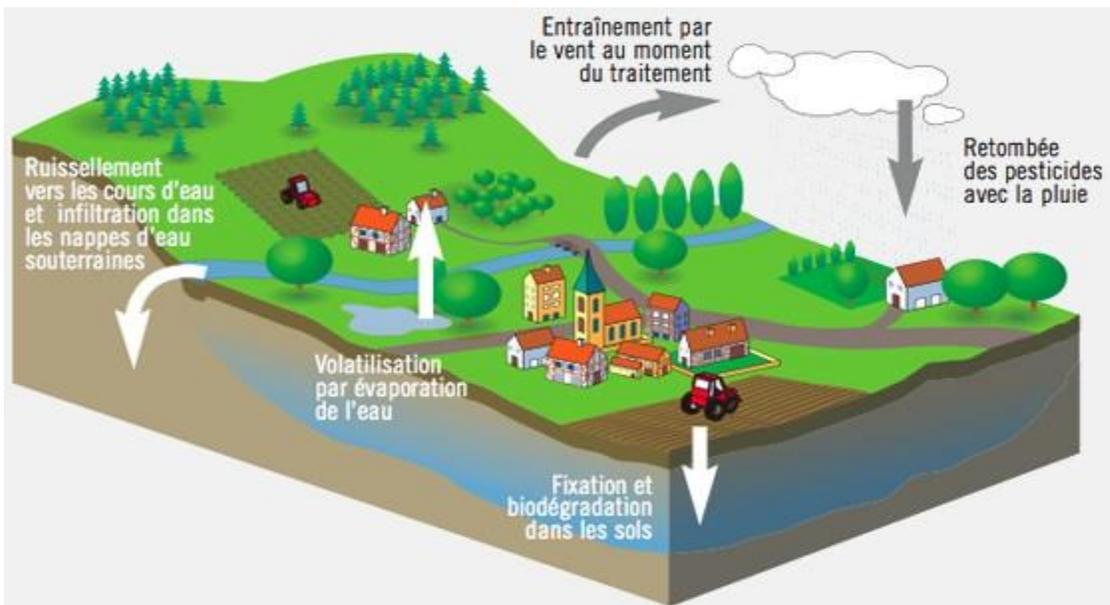


Figure 11 : Origine des polluants de l'eau : dissémination des polluants dans l'environnement et l'eau. D'après l'organisme « Ensemble pour orgeval » - Rapport de 2011

Plusieurs familles de micropolluants sont distinguées, tels que les pesticides, les micropolluants organiques (solvants, hydrocarbures), les micropolluants issus de la microbiologie, et enfin les ETM. Dans ce travail de Thèse nous nous intéressons uniquement aux micropolluants métalliques, lesquels peuvent exister, dans le milieu aqueux, sous forme dissoute ou particulaire.

Les métaux, définis dans le paragraphe 1.2.1 en tant que polluants atmosphériques primaires, peuvent, également, se retrouver dans les eaux. Ils sont regroupés sous le terme d'ETM présents à l'état naturel dans les sols et les roches. C'est d'ailleurs la présence de sols riches en ETM qui contribue à la contamination métallique des eaux, notamment en Nouvelle-Calédonie où le sol

est composé de roches ultrabasiques riches en Mn, Cr, Co, Fe et Ni sur plus de 5 000 km² (partie 1). En plus de ces apports naturels, les activités humaines contribuent fortement à la pollution des eaux par les métaux notamment avec les rejets d'usines de production (fumées, incinération des déchets ou évacuations directe de ces déchets dans les eaux) ; les exploitations minières ou encore l'agriculture (épandage d'oligo-éléments ou de boues résiduelles de stations d'épuration sur les terres cultivées, formulations de certains phytosanitaires) qui sont de nos jours, des enjeux économiques majeurs pour les pays.

Parmi ces polluants métalliques, nous retrouvons différents métaux/métalloïdes tels que l'aluminium (Al), l'As, le Cr, le Co, le cuivre (Cu), le Mn, le zinc (Zn), le Ni ou encore des métaux traces comme le Cd, le Hg ou le Pb, plus toxiques que les premiers dès de très faibles concentrations. Ces métaux sont utilisés dans de très nombreux domaines de l'industrie, et font partie de notre vie quotidienne. Par exemple le Cd est utilisé pour la fabrication des piles et dans les revêtements de surface, le Cu utilisé dans l'électronique et en tant que fongicide, le Pb pour la fabrication des tuyauteries ou encore l'Al dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et dans les matériaux de construction.

Notion de métal essentiel

Parmi tous ces éléments métalliques, certains sont considérés comme essentiels, c'est-à-dire qu'ils jouent un rôle majeur dans les processus biologiques des organismes vivants, comme le Mn, le Fe, le Zn ou encore le Cu. En ce qui concerne le Ni, la littérature diverge au sujet de la notion de métal essentiel. En effet, il n'existe aucune preuve aujourd'hui que le Ni est un métal essentiel chez les organismes aquatiques tels que les poissons, contrairement aux micro-organismes et plantes pour lesquels le caractère essentiel de ce métal est certain en tant que cofacteur de huit hydrogénases (Ragsdale, 2005, Bowen, 1966). La littérature manque de données précises sur cette notion pour le Ni, certains auteurs ont montré qu'une carence en Ni chez les animaux terrestres pouvait entraîner des retards de croissance. Cependant, chez les espèces aquatiques, le Ni étant difficilement éliminé par les poissons et crustacés, certaines études tendent à montrer que le Ni serait peu, voire non essentiel pour ces espèces, mais d'autres auteurs pensent que le Ni serait essentiel mais à de très faibles doses, ce qui pourrait expliquer sa rapide toxicité dès de faibles doses (Chowdhury et al., 2008a, Chowdhury et al., 2008b, Nielsen, 2000, Phipps et al., 2002, Tjalve et al., 1988). Le Ni est néanmoins classé cancérigène 2B tant pour l'Homme que pour

les poissons (Chiffolleau et al., 2004). Nous ne pouvons donc pas aujourd'hui affirmer son caractère essentiel ou non malgré le fait que le Ni n'aurait aujourd'hui aucune utilité connue dans aucune fonction biologique chez les poissons.

La bioamplification des métaux

Les ETM, une fois assimilés par les organismes vivants, peuvent s'accumuler le long de la chaîne trophique et ainsi perturber la faune aquatique. Après bioaccumulation, les métaux non essentiels ont la particularité de ne plus pouvoir être éliminés par les organismes aquatiques qui n'ont pas la capacité de détoxification métallique suffisante et voient leur système de défense enzymatique rapidement saturé, ce qui définit d'ailleurs la notion de « métal non essentiel ». Il est rapporté aujourd'hui qu'une pollution trop importante des eaux en métaux dans les cours d'eau douce peut entraîner une diminution de la population de certaines espèces de poissons et en particulier de celles en fin de chaîne trophique comme le thon, le saumon ou les anguilles (Pierron et al., 2008, Gauthier et al., 2009, Buttermore et al., 2018). En effet, en étant en fin de chaîne trophique, les poissons carnivores bioaccumulent et parfois bioamplifient les métaux, ce qui pourrait les impacter potentiellement plus que les espèces de début de chaîne trophique. Toutefois, les poissons possèdent des systèmes de défense contre les métaux avec la présence par exemple des métallothionéines (Dehghani et al., 2022, Polak-Juszczak, 2012). La bioamplification d'un métal signifie que la concentration de ce dernier augmente progressivement le long du réseau trophique après avoir été transféré d'une espèce à l'autre via la nourriture (Connell et al., 1998, Connell and Markwell, 1990). Une illustration de ce phénomène est présentée pour le Hg sur la figure 12. En ce qui concerne le Ni, le peu de données disponibles aujourd'hui tendent à dire qu'il ne se bioamplifierait pas, ou très peu, le long de la chaîne trophique.

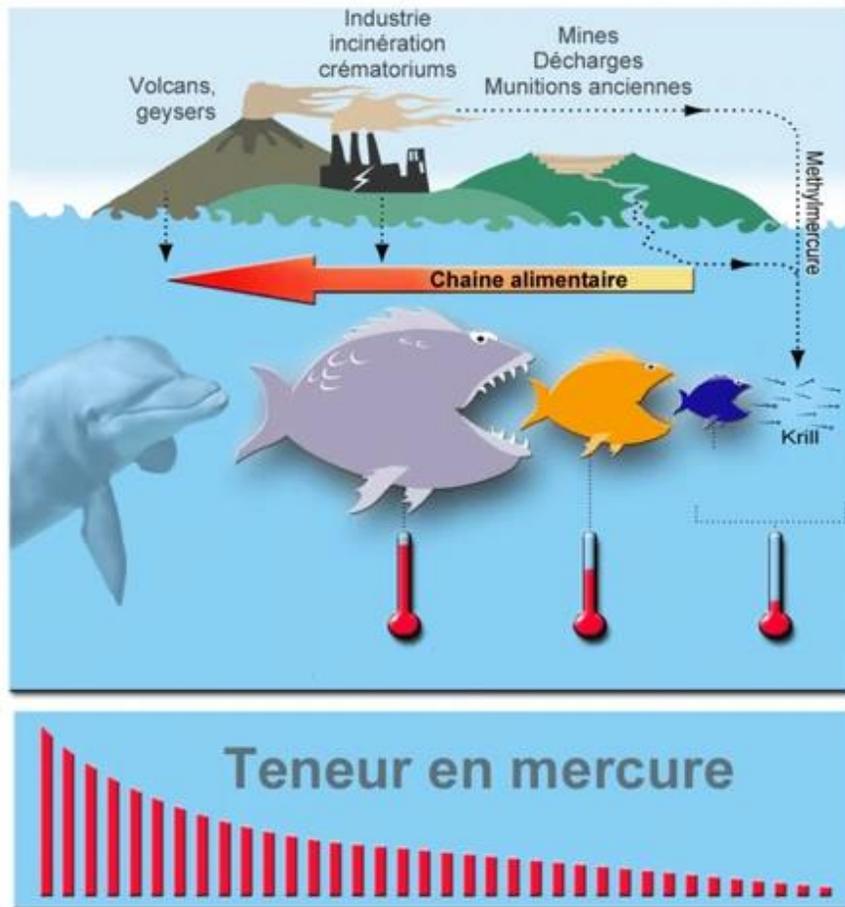


Figure 12 : Bioaccumulation du mercure le long de la chaîne trophique. Schéma simplifié de la « cinétique environnementale du mercure et de sa bioamplification dans la chaîne alimentaire » par Lamiot – Rapport personnel

Phases dissoute et particulaire des métaux

Une fois les métaux introduits dans le milieu aquatique, ils peuvent se présenter sous différentes phases en fonction des paramètres environnementaux du milieu dans lequel ils sont, la phase dissoute et la phase particulaire étant les deux grandes principales phases.

Phase dissoute : La fraction dissoute se définit par la phase retenue après la filtration de l'eau à travers des pores de diamètre égal à $0.45 \mu\text{m}$ (ou $0.22 \mu\text{m}$ selon les auteurs), cela permet de séparer les métaux dissous de ceux associés aux matières en suspension (MES). Au sein de cette phase de métaux dissous, différentes méthodes permettent ensuite de séparer les métaux dissous labiles (l'ion libre), les complexes minéraux inorganiques et les complexes minéraux organiques (LEESU). Dans les cours d'eau douce, il est estimé que 99.9 % du Ni dissous est lié aux complexes minéraux organiques (Xue et al., 2001), alors que dans les eaux marines seulement 35 % du Ni dissous s'y lierait, cela serait dû à la différence de salinité entre eau douce et eau marine.

Phase particulaire : Les MES, quant à elles, constituent la phase particulaire, celle retenue après filtration sur membrane de porosité 0.45 ou 0.22 μm . Dans les cours d'eau douce, les concentrations en métaux mesurées sont liées à de multiples paramètres notamment aux caractéristiques géochimiques des roches ou encore aux propriétés chimiques des rivières. Les métaux sous phase particulaire peuvent être issus des produits de l'érosion des sols transportés par les eaux de ruissellement, des activités industrielles ou encore des retombées sèches des particules atmosphériques définies dans le paragraphe 1.2. La majorité des métaux s'associe à la matière particulaire (Brügmann, 1995, Horowitz, 2000) et plus de 90 % de la concentration totale en métaux dans les systèmes aquatiques est présente sous forme particulaire (Calmano et al., 1993), associée aux MES (Walling et al., 2003). Pour le Ni, il est estimé qu'en moyenne 95 % du Ni total est sous forme particulaire dans les eaux de surface (IRSN).

La figure 13 permet, avec l'exemple du Cu, de voir les différentes phases d'un métal dans l'eau. Souvent, la fraction de métal labile est considérée comme la plus biodisponible (Campbell et al., 2002, Newman et al., 1994).

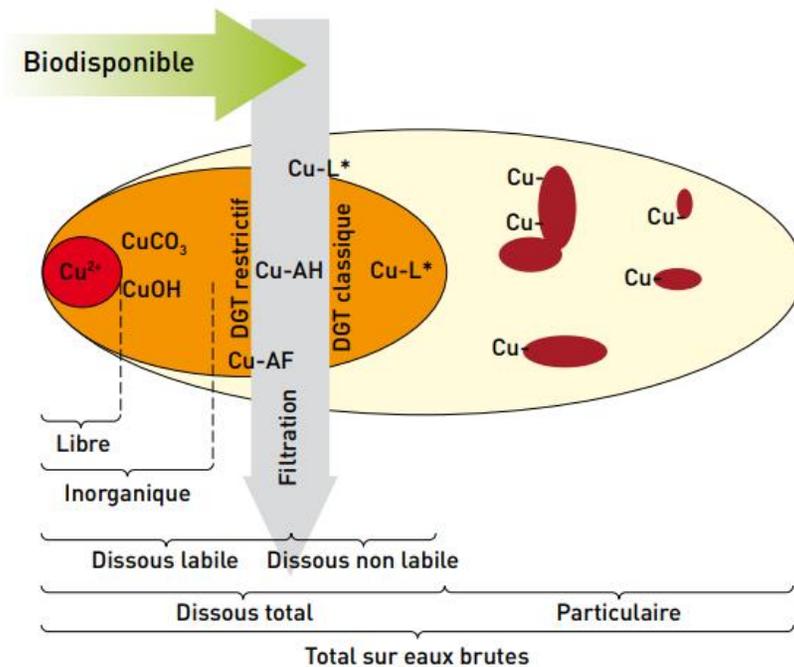


Figure 13 : Formes prises par les métaux dans les eaux de surface : cas du cuivre. La filtration (conventionnellement réalisée à 0,45 μm), permet de séparer les fractions dissoute et particulaire. Au sein de la fraction dissoute, le gradient de diffusion en couche mince sépare la fraction la plus labile et donc la plus susceptible d'être biodisponible. Cu-AH et Cu-AF : complexes organiques avec les acides humiques et fulviques ; Cu-L : autres complexes non biodisponibles. D'après le rapport du Laboratoire Eau Environnement et Système Urbains sur le cuivre. (LEESU)

En Nouvelle-Calédonie, il a été montré que du Ni sous forme particulaire était retrouvé dans les cours d'eau en aval des mines (Pasquet et al., 2018) et impactait les organismes y vivant. Cependant, il faut également tenir compte d'un autre facteur qui impacte la concentration en Ni dissous ou particulaire : les conditions météorologiques. En effet après un long épisode de pluie, il est observé une diminution de la quantité de la phase dissoute, d'une part parce qu'il y a plus de MES sur lesquelles les métaux se fixent (augmentation de la phase particulaire) et d'autre part car il y a une dilution du volume d'eau après le lessivage des sols (LEESU). Cela est vérifié en Nouvelle-Calédonie quand nous comparons deux périodes, une période sèche et une période qui fait suite à un très fort épisode de pluie pour lesquelles il est mesuré respectivement des concentrations moyennes en Ni dissous de 48 µg/L contre 8 µg/L après les pluies (Gunkel-Grillon, 2021). Ces différences influent sur les voies de contamination des poissons aux métaux.

Spéciation en phase dissoute et biodisponibilité des métaux dans les eaux douces

La toxicité ainsi que la biodisponibilité des métaux dépend également de la spéciation chimique du métal, facteur modifiant ou limitant l'accumulation de ce dernier (Nelson and Donkin, 1985). La spéciation d'un métal, ou forme chimique, qualifie la distribution de ce dernier au sein des différentes espèces chimiques qu'il peut présenter, ici, dans les cours d'eau douce, en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu aquatique dans lequel il est retrouvé (pH, salinité, présence de matière organique, d'autres métaux ou de micro-organismes etc...).

Le Ni, métal insoluble dans l'eau, peut, lorsqu'il est sous forme dissoute, s'oxyder et former des ions Ni^{2+} dans l'eau et dans les liquides biologiques, ce qui augmente sa solubilité. Comme pour la plupart des métaux, cet ion libre est généralement considéré comme l'espèce chimique la plus toxique (Blewett and Leonard, 2017), tout simplement car c'est l'espèce chimique la plus biodisponible. Le Ni rencontré dans l'eau est ainsi majoritairement présent sous forme d'ion libre Ni^{2+} qui pourra former différentes espèces chimiques tels que des sels solubles (chlorure $NiCl_2$ et $NiCl^+$, sulfate $NiSO_4$, carbonates $NiHCO_3$ et $NiCO_3$ et hydroxydes $Ni(OH)_2$ et $NiOH^+$ (figure 14).

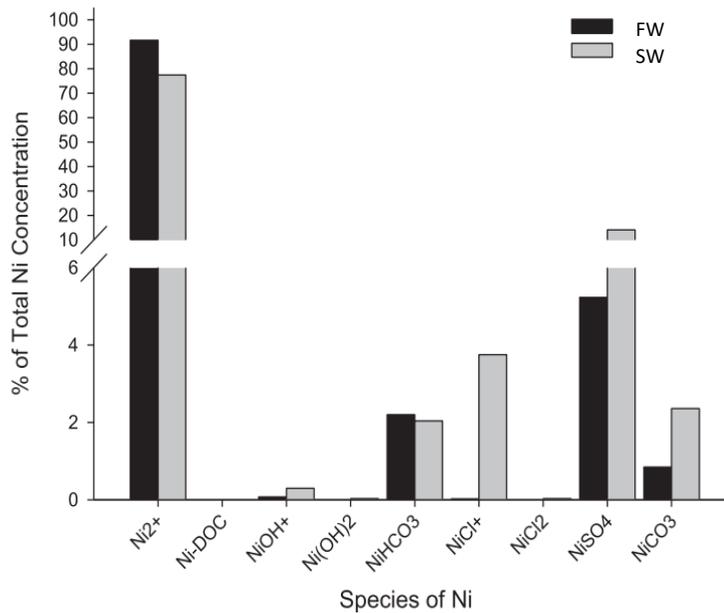


Figure 14 : Spéciation du Ni dans les eaux douces (freshwater, fw) et les eaux marines (seawater, sw) à une concentration de Ni de 100 mg/L, modélisée via visual minteq Blewett and Leonard, 2017

Dans les cours d'eau douce, les espèces chimiques formées du Ni seront affectées par la compétition avec les autres métaux (Cr, Fe, Mn et Co) et ions majeurs présentant des similitudes physico-chimiques avec cet élément et qui pourront potentiellement entrer en compétition avec lui pour les différents phénomènes d'adsorption. Des complexes anioniques et/ou organiques, formés par phénomène de complexation avec le Ni, peuvent également apparaître, notamment, par complexation avec le carbone organique dissous, plus présent dans les cours d'eau douce que marin (Glover et al., 2005, Pempkowiak et al., 1999) . Tous ces paramètres impactent donc la biodisponibilité et la toxicité du Ni (Wood et al., 2012).

Assimilation du nickel par les poissons

De la même manière que chez l'Homme, en raison de leur petite taille, les PUF et les NPs métalliques peuvent facilement être assimilés par les poissons le long de la chaîne trophique. L'assimilation des métaux peut se faire par deux voies principales. Dans un premier temps cela peut se faire par la voie directe, c'est-à-dire par assimilation directe du métal dissous dans l'eau. Cette contamination se fait majoritairement par assimilation au niveau des branchies qui est un organe de transfert chez les poissons. Cependant, contrairement à d'autres métaux comme le Cd, le Cu ou le Pb, le Ni se lierait peu aux branchies et il ne s'agirait pas de la principale voie d'entrée dans l'organisme (Niyogi and Wood, 2004). La seconde voie d'entrée est la voie trophique, par

laquelle les poissons se contaminent via leur alimentation riche en métaux. Ceux-ci sont alors plutôt concentrés dans des organes de stockage comme le foie ou les reins après avoir été absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin moyen (Le Croizier et al., 2016). Pour cette voie, le Ni serait absorbé dans l'estomac par un transporteur de haute affinité mais faible capacité alors que dans l'intestin moyen, il s'agirait d'un transporteur de faible affinité mais très haute capacité (Ojo and Wood, 2007, Leonard et al., 2009). Dans les deux cas, les conséquences sur l'écosystème aquatique d'une contamination peuvent être graves pour la population aquatique et *in fine* pour l'Homme qui représente le consommateur terminal de l'écosystème.

L'ion Ni^{2+} peut accéder à l'organisme aquatique par le biais de différents transporteurs, en particulier sur les surfaces épithéliales (Wood, 2012). Les mécanismes ne sont pas encore bien caractérisés ni compris mais l'absorption du métal libre, non complexé, peut se faire par trois voies distinctes chez les poissons :

- Le mimétisme ionique : le Ni pourrait être transporté par des voies conçues pour absorber des ions tels que le sodium (Na^+), le calcium (Ca^{2+}) ou le magnésium (Mg^{2+}) chez des organismes aquatiques comme la truite ou les algues (Bury et al., 2003, Deleebeeck et al., 2008, Deleebeeck et al., 2007), en bloquant par exemple les canaux calciques ou en entrant en compétition avec le Mg^{2+} (Lee et al., 1999, Kasprzak and Poirier, 1985).
- À travers l'épithélium des branchies via les transporteurs actifs spécifiques de métaux tels que le transporteur de métaux divalents (DMT1) existant chez les poissons (Bury et al., 2003). Des études suggèrent que le Ni^{2+} pourrait utiliser ce transporteur DMT1 pour traverser les membranes cellulaires (Gunshin et al., 1997) et se retrouver ensuite dans le plasma.
- La diffusion paracellulaire : les ions Ni^{2+} souvent liés aux protéines sanguines, contribuent ainsi à maintenir un gradient électrochimique à travers l'épithélium des branchies favorisant une absorption passive de Ni, phénomène probablement favorable que chez les poissons d'eau douce (Evans et al., 2005, Marshall, 2006).

2.3. Réglementation française pour la surveillance de la qualité des eaux

La première loi à encadrer une surveillance de la qualité des eaux en France date de 1964 et pose le principe d'une gestion de l'eau par grands bassins versants. Sont alors créées les agences de l'eau qui sont missionnées pour faire des prélèvements afin de surveiller la qualité des eaux. C'est

ensuite à partir des années 1970 que les réseaux pour la surveillance de la qualité des eaux en France se sont mis en place. Puis en 2000, une directive Européenne a été adoptée, la Directive-cadre sur l'eau ou DCE (2000/60/CE) visant à prévenir et réduire la pollution des eaux pour améliorer l'état des écosystèmes, assurer la non dégradation des ressources et milieux aquatiques, le bon état des masses d'eau et le respect des normes dans les zones protégées au niveau européen. La loi française de 2004 a transposé la DCE et orienté toute la politique de l'eau en fonction d'objectifs à atteindre notamment celui qu'en 2015 toutes les eaux aient un bon état général. Cet objectif n'ayant pas été atteint, l'échéance a été repoussée à 2021, puis 2027. En France Métropolitaine, il existe 1 900 points de surveillance de la qualité des eaux de surface continentales qui surveillent les paramètres de la DCE au moins une fois par an mais en 2013, 16 % des eaux de surface présentaient un « mauvais état ».

La surveillance de la qualité des milieux aquatiques se fonde sur trois groupes de paramètres :

Des paramètres chimiques : Environ 3 000 paramètres, regroupant notamment les nutriments azotés et phosphorés ; les pesticides ; les métaux, dont le Ni et les autres composés organiques ou inorganiques provenant de rejets industriels agricoles et urbains.

Des paramètres physiques : Environ 400 paramètres qui caractérisent les matières en suspension ou sédiments présents dans les eaux (volume, masse ...) et les conditions agissant sur le développement de la faune et la flore aquatique (température, turbidité...).

Des paramètres biologiques : Environ une dizaine étant donné que certaines espèces animales et végétales sont des bio-indicateurs de la qualité des milieux aquatiques. Pour quatre groupes d'espèces, leur composition et abondance sont suivies : les diatomées, les macrophytes, les invertébrés et les poissons.

À partir de ces paramètres, il a été établi la notion de « bon état » des eaux, résumée sur la figure 15.

En ce qui concerne la surveillance des métaux, il existe aujourd'hui, dans les eaux, une surveillance des concentrations en Fe, Cr, Zn, Hg, Cd, Pb, As et Ni.

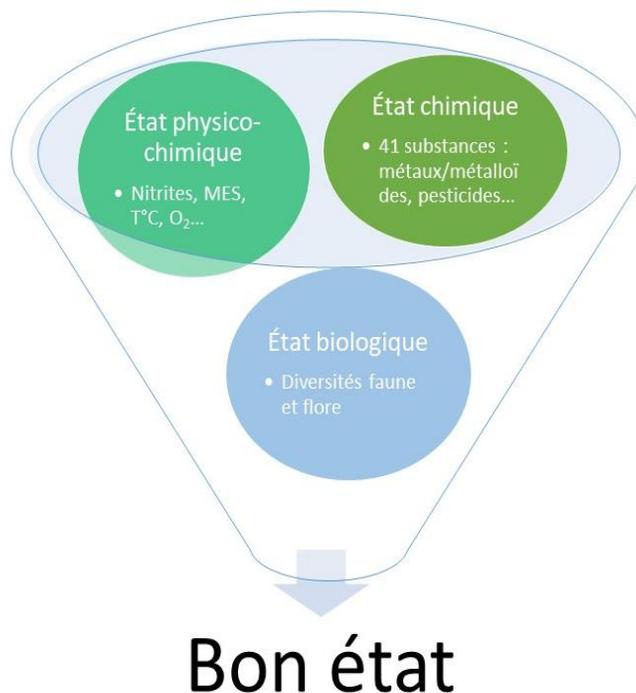


Figure 15 : Paramètres suivis dans le cadre de la DCE qui permettent de qualifier le Bon Etat des eaux, adapté du rapport sur la DCE du collectif CEVE, 2022

2.4. Réglementation de la contamination en nickel dans l'eau en Nouvelle Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, tout comme pour la surveillance de la qualité de l'air, deux organismes s'occupent de contrôler régulièrement la qualité des eaux (eaux marines, eaux de baignades, eaux pour la consommation humaine et rivières), il s'agit de la DAVAR (direction des affaires vétérinaires alimentaires et rurales à travers son service de l'eau) et de la DASS-NC (direction des Affaires sanitaires et sociales-Nouvelle Calédonie). Ces organismes ont pour mission de gérer au mieux les alertes de pollution liées à l'eau grâce à un guide d'urgence eau édité seulement depuis juillet 2008. La DAVAR est plutôt en charge de la protection de la ressource en eau alors que la DASS-NC est en charge du suivi sanitaire de l'eau de consommation. De nos jours, il n'existe aucune réglementation calédonienne, comme pour la pollution atmosphérique, c'est pourquoi la Nouvelle-Calédonie s'appuie sur le décret métropolitain de 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine. Ce même décret s'appuie lui-même sur la DCE 2008/105/CE (mise à jour de la DCE 2000/60/CE) du Parlement et du Conseil Européen qui ont établi des normes de qualité environnementale (NQE) dans le domaine de l'eau. La NQE recense 33 substances prioritaires dont 15 micropolluants parmi

lesquels nous retrouvons le Ni, considéré comme micropolluant inorganique issu principalement de l'activité industrielle. La NQE du Ni en eau côtière de transition est de 20 µg/L, en revanche, pour les eaux de surfaces intérieures, c'est-à-dire les rivières, elle est de 4 µg/L en moyenne sur une année, avec une concentration maximale admissible de 34 µg/L.

En raison de la composition des sols calédoniens, ces réglementations sont difficilement respectables dans les rivières, au vu du bruit de fond géochimique responsable de concentrations en Ni dans les rivières variant respectivement de 35 à 96 µg/L pour celles sous influence minière, et de 7 µg/L pour les rivières éloignées des mines. Nous voyons bien que même loin des mines, à partir du moment où les rivières sont sur sols ultramafiques, les valeurs de la NQE sont dépassées. En revanche, dans les rivières éloignées des sols miniers de latérites, donc sur des sols plutôt volcano-sédimentaire, nous retrouvons des concentrations en Ni dans les eaux variant de 0,05 à 2,9 µg/L (AEL, ValeNC 2013; Soproner, SLN, 2013) (Migon et al., 2007, Boula et al., 2022). À titre de comparaison, en moyenne dans le monde, la concentration en Ni dans les eaux naturelles varie en fonction des facteurs géologiques entre 0,2 et 0,7 µg/L (Chau and Kulikovskiy-Cordeiro, 1995).

Après avoir défini la pollution atmosphérique et la pollution des eaux, ainsi que les principales cibles de ces pollutions, nous allons maintenant présenter les modèles biologiques sur lesquels nous avons travaillé. En effet, en toxicologie humaine nous nous sommes intéressés à la toxicité des NPs sur des cellules vasculaires pulmonaires, notamment les CE. Les CE ont été choisies comme modèle biologique d'une part pour leur rôle majeur dans la circulation pulmonaire, et qui sont aujourd'hui connues comme étant une cible des NPs mais restent peu étudiées alors que nous savons qu'une dysfonction endothéliale peut conduire au déclenchement ou à l'exacerbation de pathologies cardiovasculaires. En écotoxicologie, notre choix s'est ainsi porté sur un poisson de fin de chaîne alimentaire, particulièrement intéressant car en plus d'une contamination directe, ces espèces peuvent également être contaminées via la voie trophique. Parmi ces poissons nous avons ainsi étudié l'anguille marbrée qui est particulièrement sensible à la contamination des eaux par les métaux, et nous nous sommes ensuite focalisés sur la fonction hépatique de ce poisson, essentielle pour son cycle de vie.

Partie 3 : Les modèles biologiques étudiés

1. Toxicologie humaine : cellules endothéliales d'artères pulmonaires

Les cellules endothéliales (CE) qui tapissent la lumière interne des vaisseaux sanguins jouent un rôle primordial dans la physiologie vasculaire pulmonaire en contrôlant le tonus vasculaire, le débit sanguin, l'homéostasie vasculaire ou encore la coagulation (Sandow et al., 2012). Ces fonctions sont assurées via la régulation de l'homéostasie calcique, la production de facteurs vasculoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO), ou encore la sécrétion de facteurs vasodilatateurs (la prostacycline, PGI₂, et l'endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) et vasoconstricteurs (l'endothéline-1, ET-1 ; la sérotonine, 5-HT ; le thromboxane A₂ ou encore l'angiotensine II). Les CE sont des cellules soumises en permanence à des forces mécaniques, ce qui va entraîner une modification de leur cytosquelette. Parmi ces forces nous retrouvons les forces de cisaillement, tel que le flux sanguin, et les forces de compression et de tension dans la paroi artérielle qui diffèrent en terme d'amplitude, de direction, d'oscillation, d'intensité et de fréquence au cours du cycle cardiaque. Les CE modifient ainsi leur structure en s'allongeant dans le sens du flux sanguin et en adaptant leur forme en fonction du débit du flux. Plus le flux est important plus les CE s'allongent, avec un remaniement de leur cytosquelette en quelques heures grâce à tous les récepteurs mécanosensibles qui les composent (Davies, 1995, Malek and Izumo, 1995). Parmi ces récepteurs, il existe des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des intégrines, des canaux potassiques ou encore des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. Les CE sont donc en capacité de remanier leurs programmes génétiques pour s'adapter aux contraintes mécaniques physiologiques. Les principales forces, fonctions et interactions des CE sont résumées dans la figure 16. Toute contrainte trop importante, non physiologique, comme une exposition à des PUF ou NPs, peut, à long terme, entraîner une dérégulation de la physiologie des CE, une dysfonction endothéliale et ainsi le déclenchement d'une pathologie cardiovasculaire.

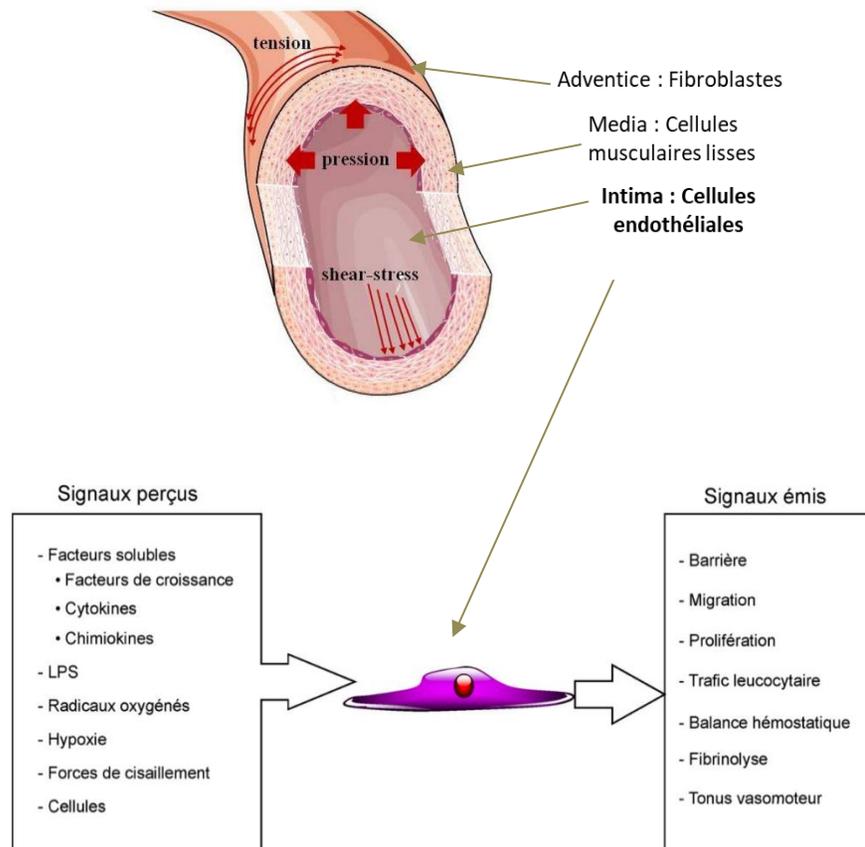


Figure 16 : Les CE à la face interne des artères à l'interface entre le sang et le tissu : forces mécaniques, signaux reçus et émis. Le flux sanguin exerce des forces physiques sur l'endothélium avec des contraintes de cisaillement (shear-stress) dues aux forces de frottements du flux sanguin. Adapté de Ait-Oufella et al., 2008, Parpaite, 2015

1.1. Les cellules endothéliales, cibles des nanoparticules

Comme énoncé précédemment (partie 2, chapitre 1.2.3.), les CE sont des cibles privilégiées des PUF et des NPs suite à une exposition par inhalation, et tout dysfonctionnement de l'endothélium pourrait être à l'origine de pathologies cardiovasculaires. En effet, de nombreuses études *in vivo*, ont démontré qu'après inhalation, les PUF inhalées, pouvaient transloquer vers la circulation systémique. Chez des souris exposées à des NPs d'or par inhalation, il a été mis en évidence que celles-ci s'accumulaient dans le sang et dans les sites inflammatoires vasculaires, ce qui pourrait expliquer le mécanisme par lequel les NPs déclencheraient des pathologies cardiovasculaires (Miller et al., 2017). Cela a, également, été mis en évidence chez l'Homme grâce à des NPs d'or et de technétium (métal utilisé en imagerie médicale) radiomarquées qui ont été retrouvées aussi bien dans la circulation systémique que pulmonaire (Nemmar et al., 2002, Nemmar et al., 2013). Une autre étude, réalisée en 2000 chez l'Homme, a comparé des coupes de parenchymes pulmonaires de personnes vivant à Mexico, ville très polluée en particules atmosphériques, et

des personnes vivant à Vancouver, ville peu polluée. Il a été trouvé une accumulation de PUF sous l'épithélium bronchique des personnes à Mexico en comparaison avec le second groupe (Churg and Brauer, 2000). Ces études laissent suggérer qu'une exposition à long terme à des concentrations importantes en PUF ou NPs induit une accumulation de celles-ci dans les alvéoles pulmonaires ainsi que dans la circulation pulmonaire, confirmant le fait que ces particules, au vue de leur taille et de leur distribution dans l'organisme, peuvent être à l'origine de pathologies respiratoires et cardiovasculaires (Churg and Brauer, 2000). L'ensemble de ces travaux démontre donc que l'endothélium pulmonaire constitue bien une cible privilégiée des PUF et NPs lesquelles entreraient en contact direct avec les CE via la circulation sanguine en traversant la barrière alvéolo-capillaire. La barrière alvéolo-capillaire est définie par la paroi qui se trouve entre les alvéoles et les capillaires (figure 17). Les capillaires étant des vaisseaux très fins qui tapissent l'ensemble des alvéoles (surface d'échange importante), cela facilite les échanges gazeux (passage d'O₂ vers la circulation sanguine et du CO₂ vers les alvéoles pour son élimination). Les NPs et PUF, qui présentent par ailleurs une très grande réactivité de surface, ont ainsi une grande surface d'échange pour pouvoir traverser cette paroi et rejoindre la circulation sanguine systémique puis pulmonaire pour se retrouver en contact direct avec les CE d'artères pulmonaires. Les particules les plus fines de Ni et de NiO pourraient ainsi être à l'origine d'altérations cellulaires et moléculaires dans les CE après inhalation. Cependant, aujourd'hui, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets cellulaires induits par ce type de particules.

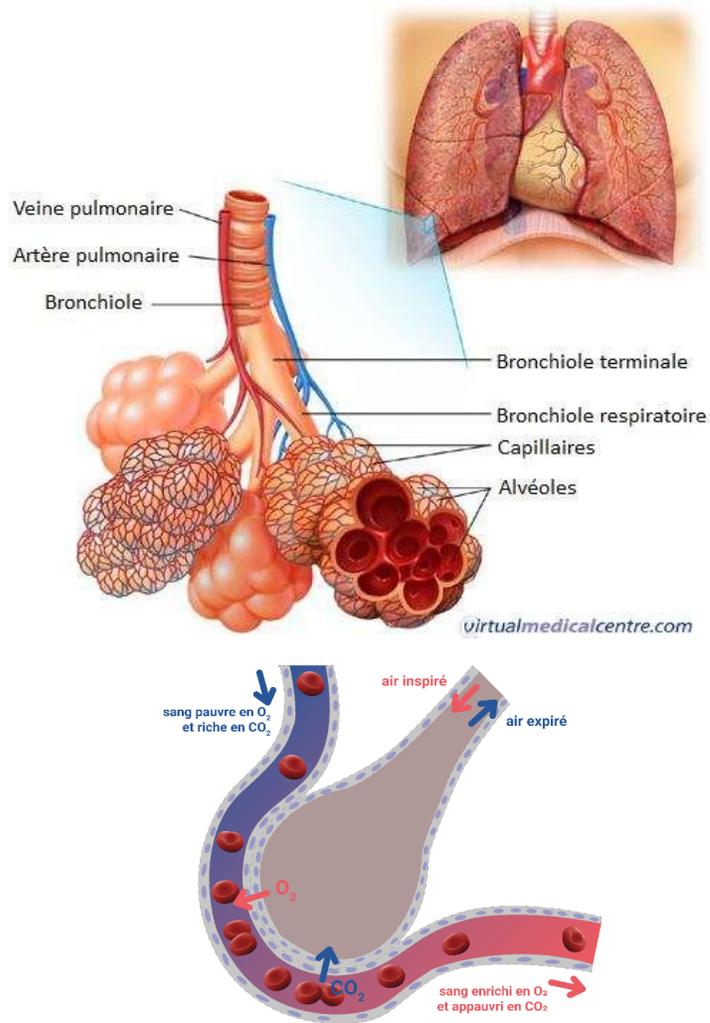


Figure 17 : Schéma de la barrière alvéolo-capillaire et échanges gazeux au niveau des alvéoles. les sacs alvéolaires sont entourés de capillaires sanguins, le sang est ré oxygéné et le CO₂ éliminé. D'après Virtual Medical center© et Alloprof, 2019.

1.2. L'homéostasie calcique dans les cellules endothéliales

La signalisation calcique joue un rôle important dans les fonctions endothéliales en régulant le tonus vasculaire, le débit sanguin, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore la production de facteurs vasoactifs comme le NO. Les variations de calcium intracellulaire, $[Ca^{2+}]_i$, dans les CE, permettent ainsi le maintien de l'homéostasie calcique cardiovasculaire à une concentration d'environ 100 nM (Tran and Watanabe, 2006, Usachev et al., 1995). Le calcium peut provenir de sources extracellulaires (via la membrane plasmique) ou intracellulaires notamment de trois compartiments différents : le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie ou les lysosomes. Toute augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ doit pouvoir être régulée par ces différents compartiments afin de maintenir cette homéostasie calcique. En effet, toute augmentation ou diminution de $[Ca^{2+}]_i$ non

régulée dans les CE provoque des dommages cellulaires en activant, notamment, les voies de l'apoptose (Trump and Berezsky, 1995, Orrenius et al., 2003).

1.2.1. Le calcium dans le réticulum endoplasmique

Le RE est le principal organite de stockage du Ca^{2+} en concentrant près de 75 % des réserves calciques avec une concentration calcique du RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) en calcium libre d'environ 500 μM (Yu and Hinkle, 2000, Lam and Galione, 2013). Le RE a un rôle essentiel dans la synthèse et les modifications post-transcriptionnelles des protéines nécessitant le Ca^{2+} comme second messager (Schwarz and Blower, 2016). L'homéostasie calcique réticulaire est régulée par les entrées et les sorties du Ca^{2+} dans le RE.

Les voies de sortie

La libération du Ca^{2+} vers le cytoplasme ou la mitochondrie se fait principalement par deux types de canaux calcique : les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3R) ou les récepteurs à la ryanodine (RyR, présents à la membrane du RE).

Les RyR existent sous trois isoformes (1, 2 et 3) dont l'expression dépend du type de tissu (cœur, cerveau...). Les RyR sont stimulés par divers mécanismes dont le principal modulateur est le Ca^{2+} . L'ADP ribose cyclique et la caféine sont également rapportés comme étant des activateurs des canaux RyR. La ryanodine aurait peu d'effet sur des CE en culture ce qui interroge sur la présence de ce récepteur dans l'endothélium. Cependant, il a été suggéré que les RyR participaient aux oscillations du Ca^{2+} dans les CE (Laskey et al., 1992, Ziegelstein et al., 1994) même si les caractéristiques moléculaires de ces récepteurs ne sont pas déterminées au niveau endothélial. Les IP_3R peuvent également relarguer du Ca^{2+} du RE vers le cytosol et existent aussi sous trois isoformes différents (Bosanac et al., 2004). Ils sont activés principalement par l' IP_3 (l'inositol 1,4,5-triphosphate) produit après l'activation de récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Les IP_3R fonctionnent alors comme des pompes à Ca^{2+} pour le libérer (Tran et al., 2000). Le Ca^{2+} en concentration trop faible dans le cytoplasme active ces récepteurs afin que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit restaurée. Il a été démontré que d'autres facteurs intervenaient dans l'activation de ces canaux dans les CE d'artères tels que la bradykinine (agoniste qui stimule la production d' IP_3), le stress oxydant, l'adénosine triphosphate (ATP), le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lui-même (afin de restaurer la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) ou encore des protéines kinases comme la calmoduline (Bansaghi et al., 2014, Watanabe et al., 1996).

Les voies d'entrée

La seule voie d'entrée connue aujourd'hui du cytoplasme vers le RE est celle faisant intervenir les pompes sarco/endoplasmique réticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), qui existent eux aussi sous trois isoformes (1 à 3). Mais c'est essentiellement SERCA3 qui est exprimé dans les CE des artères pulmonaires (Balint et al., 2014). Cette voie est uniquement activée par l'ATP qui va permettre un changement de conformation des canaux SERCA permettant une entrée de deux ions Ca^{2+} dans le RE à partir du cytoplasme. Cette voie de signalisation a pour objectif de diminuer la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Les pompes SERCA peuvent également être inhibées par des protéines comme la thapsigargin, le vanadate ou encore le 2,5-di(t-butyl)hydroquinon), tBHQ (Lytton et al., 1991). L'entrée du calcium du RE est donc un mécanisme actif (besoin d'ATP) qui va dépendre de l'état d'énergie de la cellule.

Toutes ces voies sont résumées dans le schéma de la figure 18.

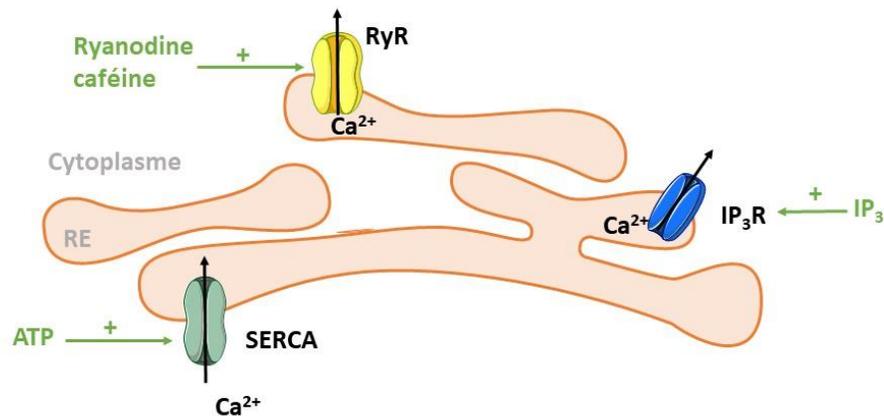


Figure 18 : Schéma des différents canaux calciques présents à la membrane du RE dans les CE. RyR : récepteurs à la ryanodine ; IP₃R : récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate ; SERCA : Sarcoplasmique Réticulum Calcium ATPase ; ATP : Adénosine triphosphate ; Ca^{2+} : calcium ; RE : Réticulum endoplasmique

1.2.2. Le calcium mitochondrial

Au niveau physiologique, la mitochondrie est la principale source de production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'ATP via la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Cependant, elle contient également 25 % des réserves calciques intracellulaires (Wood and Gillespie, 1998), lui permettant d'adapter ses différentes fonctions pour répondre au mieux aux besoins cellulaires. En effet, la mitochondrie est le lieu de multiples processus biologiques et cellulaires (phosphorylation oxydative, cycle de Krebs, β -oxydation...). Dans cette partie nous nous limiterons uniquement à son rôle dans la régulation calcique dans la mesure où c'est un organe qui est un acteur de la régulation de l'homéostasie calcique.

La mitochondrie est composée de deux membranes, la membrane interne mitochondriale et la membrane externe mitochondriale, qui est à l'origine de la présence de deux compartiments distincts : l'un entre les deux membranes nommé l'espace intermembranaire, et l'autre à l'intérieur de la mitochondrie appelé la matrice mitochondriale (figure 19).

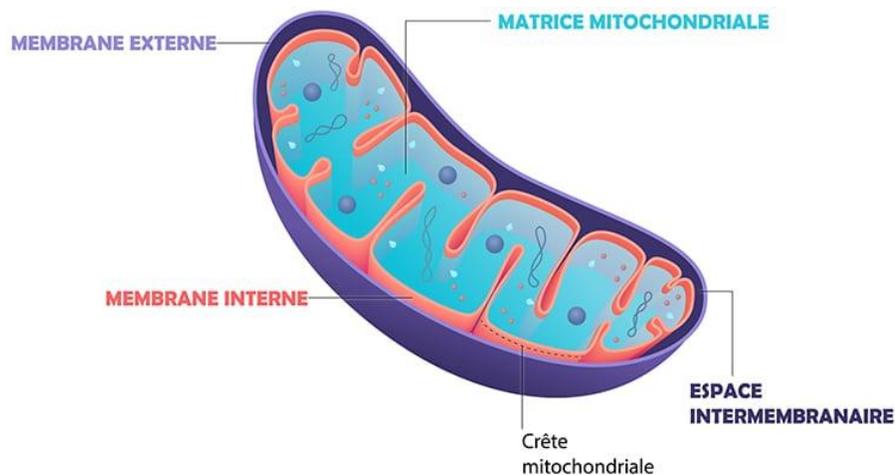


Figure 19 : Structure d'une mitochondrie. D'après Laboratoire Nutrixéal.

Cette structure complexe est ainsi à l'origine de la présence d'un potentiel de membrane mitochondrial négatif, Ψ_{MP} , dont le maintien est essentiel à la survie cellulaire et va conditionner l'état physiologique des CE. La concentration en Ca^{2+} mitochondriale ($[Ca^{2+}]_m$) conditionne le Ψ_{MP} , donc la survie des cellules.

Les voies d'entrée

Il a, dans un premier temps, été décrit les voies d'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie, en tant que voies de « sauvetage » par sa proximité avec le RE en absorbant l'excès de calcium du RE (Patergnani et al., 2011). Les mitochondries apparaissent en étroite relation avec cet organe surtout dans les régions riches en IP_3R (Tran et al., 2000), sachant que l'entrée du Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire dépend aussi du ΨMP .

La seule voie d'entrée décrite aujourd'hui est celle faisant intervenir les canaux VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) existant sous 3 isoformes (1 à 3) ancrés à la membrane mitochondriale externe (Messina et al., 2012). L'activité de VDAC est régulée par plusieurs protéines dont les protéines de la famille Bcl-2 impliquées dans le déclenchement des voies de l'apoptose (Shimizu et al., 1999). Ainsi, un excès de Ca^{2+} dans le cytoplasme entraînera une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ puis de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{m}}$ qui entraînera une activation des voies de l'apoptose par activation de *bax*, facteur pro-apoptotique, et des caspases conduisant à la mort cellulaire en réponse à un excès de calcium dans les CE. La voie de l'apoptose sera par ailleurs détaillée dans la partie 4, paragraphe 1.5.

La membrane mitochondriale interne, imperméable au calcium, est également dotée d'un canal calcique. Il s'agit d'un macro complexe protéique, le mCU (mitochondria Calcium Uniporter), son rôle et fonctionnement n'est pas détaillé dans cette Thèse.

Les voies de sortie

Trois canaux permettent la sortie du calcium mitochondrial vers le cytoplasme : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore). Tous les trois sont situés sur la membrane interne mitochondriale. L'efflux de calcium mitochondrial peut avoir lieu en condition pathologique dans les CE mais également physiologique avec une ouverture transitoire du mPTP afin de maintenir le ΨMP .

Toutes les voies d'entrée et de sorties, ainsi que l'activation de l'apoptose dû à un excès de calcium sont résumées dans la figure 20.

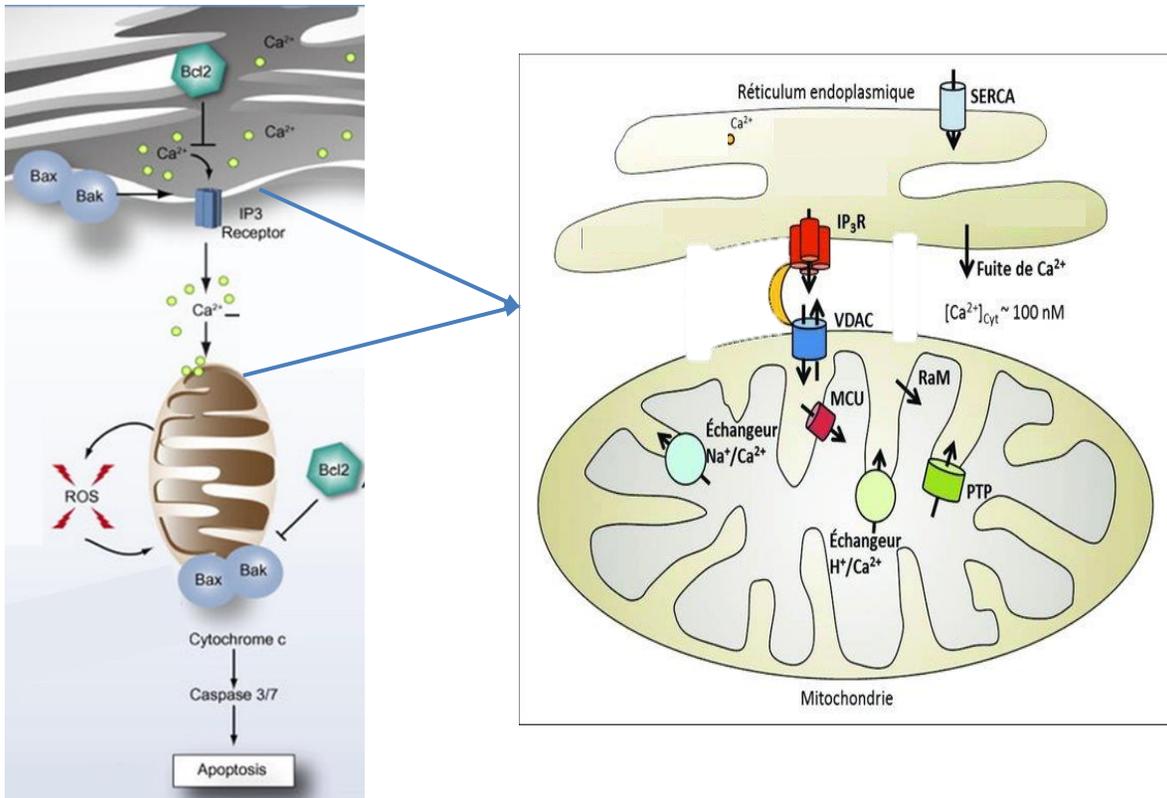


Figure 20 : Apoptose induite par le stress du RE avec un excès de calcium et canaux calciques mitochondriaux. L'absorption de calcium par les mitochondries entraîne la perméabilisation mitochondriale et la libération de cytochrome c, activant les voies de l'apoptose . Malhi and Kaufman, 2011 et Bonneau et al., 2013.

1.2.3. Le calcium extracellulaire

Dans le milieu extracellulaire, la concentration calcique ($[Ca^{2+}]_{EC}$) est d'environ 1.8 mM, ce qui permet de générer un gradient électrochimique avec le milieu intracellulaire et ainsi de contrôler la $[Ca^{2+}]_i$ pour maintenir l'homéostasie calcique. Ce contrôle s'effectue via de multiples mécanismes de régulation et différents canaux calciques membranaires.

Les voies d'entrée

Plusieurs canaux permettent l'influx calcique dans les CE : les canaux calciques voltages dépendants, les canaux mécanotransducteurs comme les canaux stretch activated channels (SAC) dont les principaux récepteurs sont les Transition Receptor Potential (TRPs). Dans cette Thèse, nous allons nous concentrer sur une seule famille protéique, celle des TRPs reconnus pour avoir un rôle dans la régulation du tonus vasculaire dans les CE (Zhang and Gutterman, 2011). Ces canaux sont caractérisés par leur sensibilité à différents stimuli tels que la température,

l'étirement membranaire ou encore les forces de cisaillement (Ambudkar et al., 2017). Les TRPs forment une superfamille divisée en 7 sous familles dont les TRPV (Vanilloïd) parmi lesquels les TRPV1/4. Les canaux impliqués dans les variations calciques endothéliales sont surtout les TRPV1 et TRPV4. L'activité de ces derniers est régulée par différents facteurs comme l'étirement de la membrane et la température mais aussi par le calcium mitochondrial et réticulaire (Pedersen and Nilius, 2007). En ce qui concerne le calcium réticulaire, il existerait une voie de signalisation appelée SOCE (Store Operated Calcium Entry) permettant de compenser la diminution de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ ne pouvant plus compenser la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ en permettant l'entrée de calcium extracellulaire vers l'espace intracellulaire.

Les voies de sortie

L'efflux du calcium dans les CE se fait principalement par les canaux PMCA (Plasma Member Calcium ATPase) qui utilise un mécanisme d'efflux actif nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe également des échangeurs comme l'échangeur Na^+/Ca^{2+} permettant la sortie d'un ion calcium vers le milieu extracellulaire en échange de l'entrée de trois ions sodium dans la cellule, selon le gradient de sodium (Patrick Lacolley, 2007).

Les différents canaux sont présentés sur la figure 21.

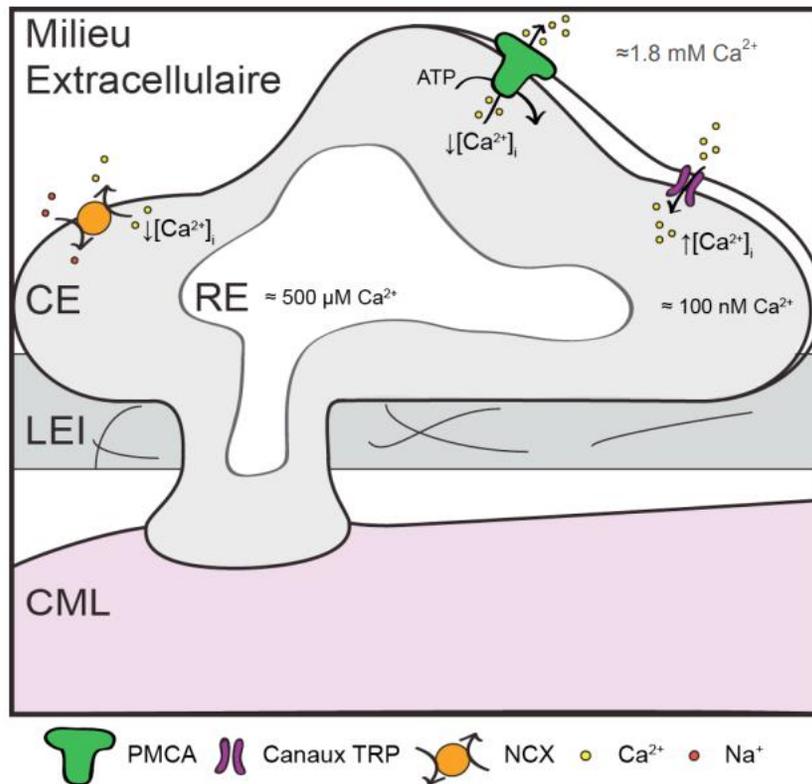


Figure 21 : Protéines impliquées dans les dynamiques calciques liées au milieu extracellulaire et à la membrane plasmique. L'efflux de calcium (Ca^{2+}) du milieu intracellulaire de la CE est possible grâce à la pompe PMCA de la membrane plasmique et à l'échangeur sodium (Na^+)/ Ca^{2+} (NCX). Le Ca^{2+} entre dans la cellule par des canaux non sélectifs au Ca^{2+} de la famille des TRPs. La concentration de Ca^{2+} extracellulaire est estimée à 1.8 mM. LEI : lamina élastique interne, CML : cellule musculaire lisse, RE : réticulum endoplasmique, PMCA : plasma membrane Ca^{2+} ATPase, ATP : adénosine triphosphate. D'après la thèse de Fanny Toussaint, 2017.

1.2.4. Régulation du tonus vasculaire via le monoxyde d'azote

Le NO est un puissant vasodilatateur produit par les CE qui permet une relaxation des cellules musculaires lisses (CML) avec lesquelles les CE sont en échange permanent. Il joue un rôle majeur dans le maintien du tonus vasculaire. La production de NO dépend entre autre de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, c'est la raison pour laquelle nous le décrivons dans cette partie.

L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ va activer la voie de production du NO dans les CE à partir de la L-arginine grâce à une enzyme appartenant à la famille des NO synthases (NOS). Plusieurs iso-enzymes constituent cette famille, mais, dans les CE est présente l'endothéliale NOS (eNOS) qui est ainsi activée par le calcium qui se couple à la calmoduline. Cette réaction nécessite de l'oxygène et produit en plus du NO de la L-citruline. La eNOS peut, également, être activée par

des phosphorylations (Maniatis et al., 2006). Une fois produit, le NO va diffuser à travers la membrane plasmique des CE vers les CML où il va induire la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPC) à partir du guanosine triphosphate (GTP), ce qui va permettre de diminuer la concentration calcique dans les CML et ainsi moduler le tonus vasculaire via la relaxation des CML (Dias et al., 2011).

1.2.5. Les autres facteurs vasodilatateurs

Il existe d'autres molécules vasodilatatrices qui nécessitent également du calcium comme second messenger. Les deux principales molécules sont la PGI₂ et l'EDHF. Ces molécules sont sensibles à des stimuli tels que l'inflammation ou les forces de cisaillement (Wong and Vanhoutte, 2010). L'EDHF va quant à lui faire sortir le potassium (K⁺) des CML via des canaux potassiques calcium dépendants ce qui va entraîner une hyperpolarisation de la membrane des CML (Ma et al., 2013b). Ces voies activent également la relaxation des CML via une diminution de la concentration calcique dans les CML (Saliez et al., 2008, Naik and Walker, 2018).

Les différentes voies des facteurs vasodilatateurs sont résumées dans la figure 22.

AA : Acides aminés
 AMPc : Adenosine monophosphate cyclique
 ATP : Adénosine tri-phosphate
 Ca²⁺ : Calcium
 CML : Cellule musculaire lisse
 EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor
 eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale
 GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
 GTP : Guanosine triphosphate
 K⁺ : Potassium
 L-Arg : L-Arginine
 NO : Monoxyde d'azote
 PGI₂ : Prostacycline 2

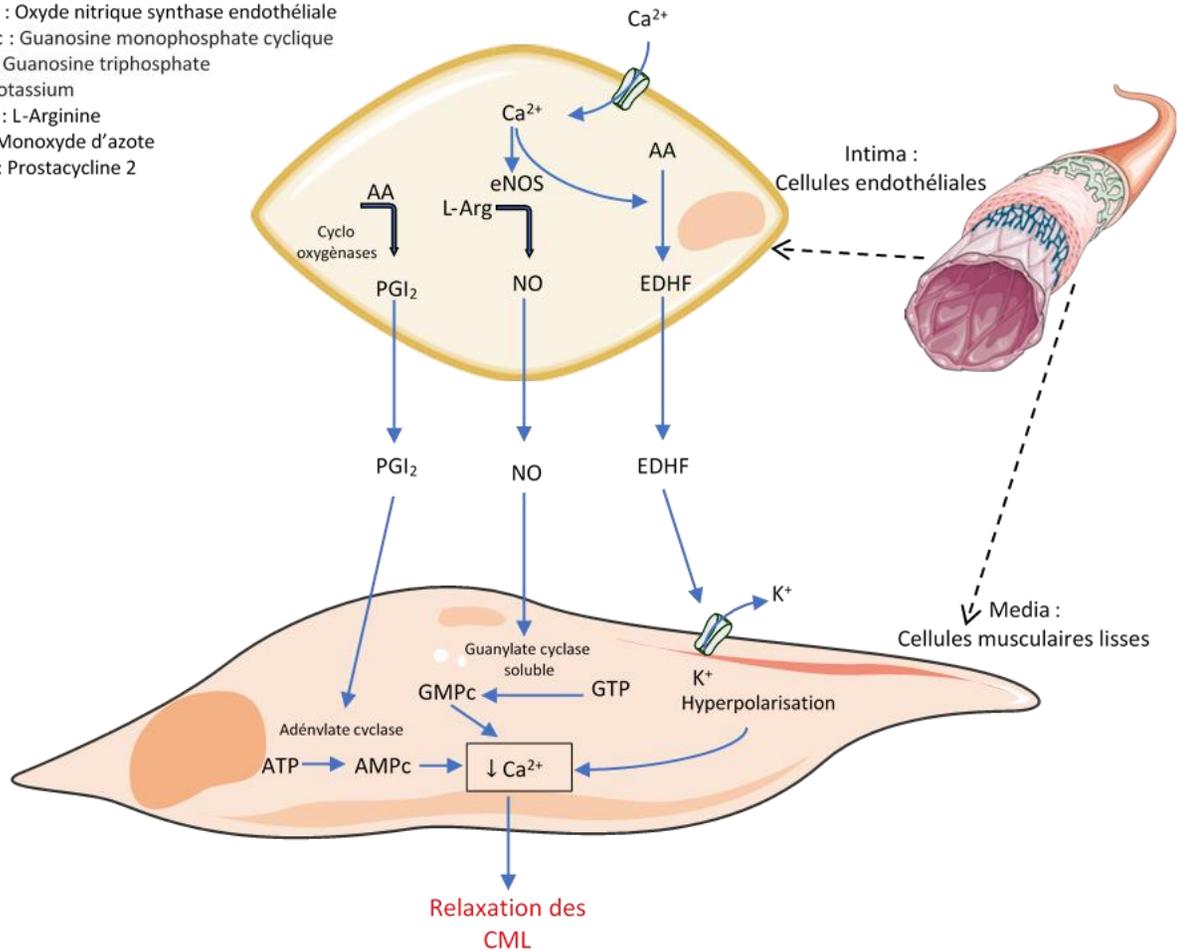


Figure 22 : Voies des molécules vasodilatatrices des CE vers les CML.

1.3. Les autres facteurs vasoconstricteurs non dépendants du calcium

Dans les CE, afin d'assurer un équilibre entre relaxation et contraction des CML, il existe également différents facteurs vasoconstricteurs tels que l'ET-1, la 5-HT, le thromboxane A2 ou encore l'angiotensine II. L'ET-1 nous intéresse particulièrement car elle est connue pour avoir un rôle essentiel dans les pathologies cardiovasculaires (Levin, 1995). L'ET-1 est synthétisée par l'endothélium. Sa synthèse peut être modulée par la thrombine, les catécholamines, l'angiotensine II, les cytokines ou encore les ERO. Le NO peut inhiber sa synthèse, entraînant ainsi une relaxation des CML. Il est par ailleurs rapporté qu'une dysfonction endothéliale est souvent associée à une diminution de la biodisponibilité du NO corrélée à une augmentation de la

synthèse d'ET-1 (Bohm and Pernow, 2007), comme notamment dans des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension pulmonaire (HTP).

1.4. L'hypertension pulmonaire

1.4.1. Définition et classification

L'HTP est une pathologie de la circulation pulmonaire qui toucherait un peu moins de 1 % de la population mondiale, mais jusqu'à 10 % des plus de 65 ans (Hoeper et al., 2017). La prévalence de l'HTP en France est de 1 à 9 pour 100 000 habitants, ce qui en fait une maladie rare mais grave et de mauvais pronostic.

L'HTP se manifeste par une tension élevée dans les artères pulmonaires, soit, une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au repos > 20 mm Hg alors que chez un sujet sain la PAPm est comprise entre 10 et 15 mm Hg (Ma et al., 2013a, Simonneau et al., 2013). Il existe de nombreux facteurs favorisant le développement de l'HTP, comme une mutation génique (BMPP2), une pathologie préexistante (maladie de la thyroïde, de l'hémoglobine, cardiopathie congénitale ou infection au VIH), une mauvaise dilatation des artéioles chez le nouveau-né, à la suite d'une prise de médicaments anorexigènes (fenfluramine et dérivés, benfluorex) ou encore suite à une exposition chronique à la pollution atmosphérique (Hoeper et al., 2016).

Le diagnostic de l'HTP est souvent tardif dû à la non spécificité des symptômes (essoufflements, dyspnée, signes d'insuffisance cardiaque droite...). Le diagnostic est posé après réalisation d'un examen de référence qui est un cathétérisme cardiaque droit, ce qui donne les valeurs de pressions de l'oreillette, puis du ventricule et enfin de l'artère pulmonaire (Galie et al., 2013). Cet examen peut être complété par un électrocardiogramme qui permettra de voir s'il y a des anomalies cardiaques (Montani et al., 2013). Des analyses biologiques seront également réalisées pour doser certains facteurs comme le taux de protéine C réactive (CRP), marqueur d'un phénomène inflammatoire.

Il existe une classification internationale regroupant les différentes formes d'HTP selon l'OMS. Cette classification permet de regrouper les différentes manifestations pathologiques présentant des similitudes au niveau des signes cliniques, de la symptomatologie ainsi que de la prise en charge thérapeutique (figure 23) (Lador et al., 2009, Bongard et al., 2012). L'HTP regroupe l'ensemble des hypertensions pulmonaires alors que l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) regroupe uniquement les HTP du groupe 1 (Galie et al., 2015). Nous nous intéressons ainsi à l'HTP

d'origine hypoxique appartenant au groupe 3 qui touche les artères pulmonaires distales, et se caractérise par un remodelage, une vasoconstriction et une inflammation détaillés dans le paragraphe suivant (Montani et al., 2013).

I Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) I.1 Idiopathique (HTAPi) I.2 Héritaire I.2.1 Associée à une mutation BMPR2 I.2.2 Associée à une mutation ALK1, endogène (avec ou sans maladie de Rendu-Osler) I.2.3 Inconnue I.3 Induite par des drogues ou des médicaments I.4 Associée à: I.4.1 Connectivite (sclérodermie, CREST, etc.) I.4.2 Infection par le VIH I.4.3 Hypertension portale I.4.4 Cardiopathie congénitale I.4.5 Schistosomiase I.4.6 Anémie hémolytique chronique (thalassémie, drépanocytose) I.5 Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né	3 Hypertension pulmonaire due à une pathologie pulmonaire ou une hypoxémie 3.1 Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) 3.2 Pneumopathie interstitielle 3.3 Autres pathologies pulmonaires restrictives ou obstructives 3.4 Pathologie du sommeil 3.5 Hypoventilation alvéolaire 3.6 Exposition chronique à l'altitude 3.7 Anomalies du développement
Ib Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire	4 Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (CTEPH)
2 Hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche 2.1 Dysfonction systolique 2.2 Dysfonction diastolique 2.3 Valvulopathie	5 Hypertension pulmonaire d'origine non déterminée et/ou multifactorielle 5.1 Pathologie hématologique (maladie myéloproliférative, splénectomie, etc.) 5.2 Pathologies systémiques (sarcoïdose, histiocytose langerhansienne, lymphangioléiomyomatose, neurofibromatose, vasculite, etc.) 5.3 Pathologie du métabolisme: maladie de stockage du glycogène, maladie de Gaucher, troubles thyroïdiens 5.4 Autres: obstruction tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique dialysée

Figure 23 : Nouvelle classification diagnostique de l'hypertension pulmonaire. Il existe 5 groupes d'HTP différentes. Hoepfer et al., 2017

1.4.2. Physiopathologie de l'HTP

L'HTP se caractérise par une obstruction vasculaire au niveau des petites artères pulmonaires entraînant une augmentation progressive de la résistance vasculaire, dû au remodelage obstructif de la paroi des vaisseaux. Il est retrouvé trois grandes caractéristiques physiopathologiques à l'HTP. Les trois couches cellulaires (CML, CE et fibroblastes) interviennent dans la physiopathologie de l'HTP mais la dysfonction endothéliale est un marqueur précoce de la maladie.

Hyperréactivité

Au cours de l'HTP, une hyperactivité est observée. Elle se traduit par un déséquilibre de la balance entre la production de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs, en faveur d'une vasoconstriction. Cette vasoconstriction à long terme conduit ainsi à une réduction du diamètre des vaisseaux et peut conduire à une défaillance du ventricule droit qui doit plus travailler pour compenser cette augmentation de la PAPm, ce qui peut conduire au déclenchement d'une

insuffisance cardiaque droite puis au décès (Seferian and Simonneau, 2014). Différents mécanismes sont impliqués dans l'hyperréactivité. Tout d'abord nous observons une altération de l'endothélium qui n'arrive plus à produire suffisamment de facteurs vasodilatateurs au profit d'une sécrétion accrue de facteurs vasoconstricteurs, avec notamment une diminution significative de NO ainsi qu'une augmentation de la production d'ET-1 et de 5-HT (Konik et al., 2013, Giaid et al., 1993, Kaneko et al., 1998, Herve et al., 1995, Guibert et al., 2004). Cette dysfonction endothéliale est à l'origine d'un défaut de communication entre les CE et les CML responsable d'une prolifération excessive des CML observées dans l'HTP (Izikki et al., 2009). D'autre part, l'hyperréactivité est, également, provoquée par une perturbation de l'activité des canaux ioniques entraînant une augmentation de la concentration calcique dans les CML ce qui participe à la vasoconstriction des artères. Le rôle des CE reste peu clair mais il semblerait qu'une altération des canaux TRPs dont les TRPV pourrait entraîner une augmentation du calcium basal des CML (Suresh and Shimoda, 2017, Cussac et al., 2020, Parpaite et al., 2016).

Remodelage

La prolifération des CML dans les petites artères pulmonaires périphériques est une caractéristique commune à toutes les formes d'HTP (Montani et al., 2013), le diamètre interne des vaisseaux est alors réduit (figure 24), ce qui conduit à une augmentation de la pression du flux sanguin sur les CE. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de ce phénomène comme une dysfonction endothéliale, une prolifération incontrôlée des cellules ou encore une résistance à l'apoptose. Cette prolifération accrue des cellules se produit dans les deux types cellules, CML et CE (Shimoda et al., 2000). Les mécanismes de prolifération des CE sont cependant moins bien connus. Le remodelage est un phénomène tardif et irréversible amplifiant ainsi l'augmentation des résistances vasculaires.

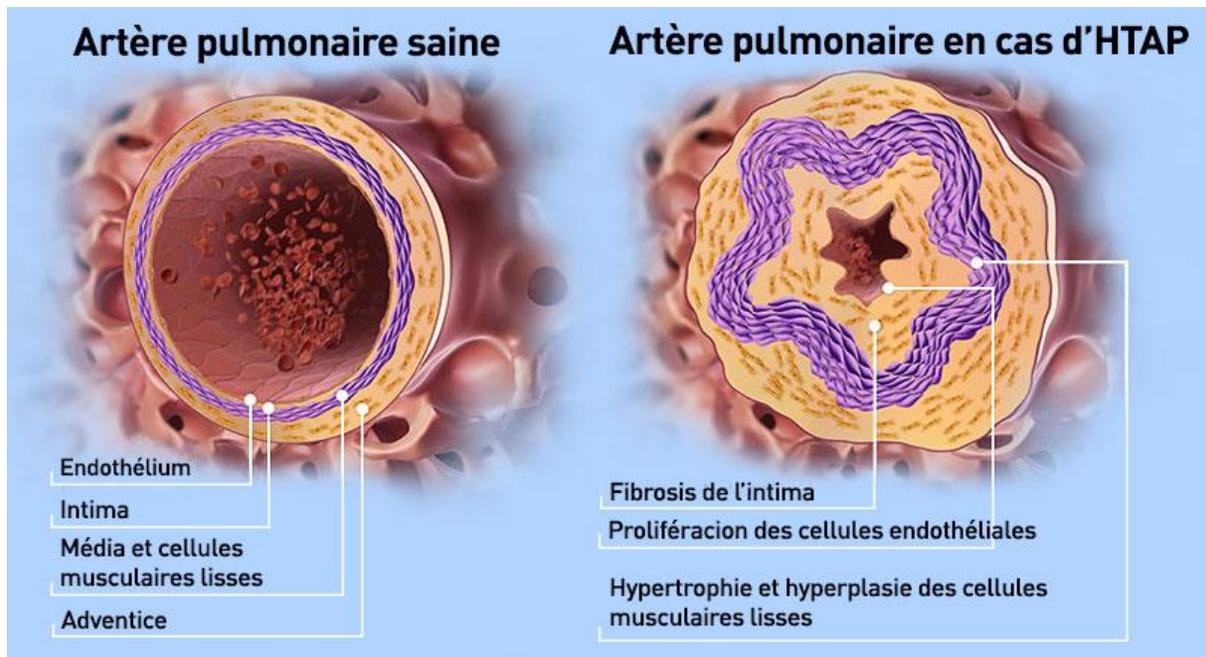


Figure 24 : Remodelage artériel dans une artère pulmonaire saine et dans le cas d'une HTP, modifié. Remodelage des trois couches cellulaires. Galié et al., 2010

Inflammation

L'activation des voies de l'inflammation est la troisième caractéristique de l'HTP. Il s'agit d'un mécanisme majeur dans le déclenchement de la pathologie. Les patients atteints d'HTP ont une infiltration importante de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes) dans la région péri-vasculaire. L'augmentation d'interleukines pro-inflammatoires tels que les IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL10, IL12-p70 le TNF- α et notamment les IL-6, est un marqueur de gravité et d'avancement de la pathologie, ce sont des facteurs solubles retrouvés dans le sang (Rafikova et al., 2019, Chaouat et al., 2009). L'inflammation et les mécanismes associés pourraient contribuer au remodelage vasculaire.

1.4.3. Signes cliniques et traitements

De nombreux symptômes peuvent être confondus avec ceux de l'asthme. D'apparition progressive la dyspnée d'effort est retrouvée chez plus de 95 % des patients (Runo and Loyd, 2003). Une fatigue importante, des étourdissements ou évanouissements peuvent être mentionnés tout comme des douleurs thoraciques, ou des syncopes à l'effort, considérées comme critères majeurs de gravité associés avec un rythme cardiaque accéléré. Des gonflements au niveau des chevilles et des jambes peuvent aussi apparaître.

Il n'existe actuellement aucun traitement médicamenteux curatif pour l'HTP. Cependant, plusieurs classes thérapeutiques peuvent être proposées comme traitement symptomatique :

- Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline (bosentan); les inhibiteurs de phosphodiesterase cGMP-spécifique de type 5, PDE5 (sildénafil) et les analogues de la PGI₂ (iloprost) qui permettent de vasodilater les vaisseaux.
- Les anticoagulants (anti-vitamine K, AVK), permettant de réduire les risques de thromboses.
- Les diurétiques, permettant de diminuer la surcharge ventriculaire droite.

Le seul traitement curatif est la transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire.

1.4.4. Pollution atmosphérique et hypertension pulmonaire

De nombreuses études épidémiologiques chez l'Homme ont montré que les PUF et les NPs pouvaient être à l'origine de pathologies respiratoires (asthme, BPCO) et cardiovasculaires (hypertension, athérosclérose, HTP ou encore infarctus du myocarde) (Brown and Griendling, 2015, Cao, 2018, Nemmar et al., 2017, Mills et al., 2009, Chalupa et al., 2004). L'endothélium a un rôle clef dans le contrôle de la physiologie vasculaire pulmonaire et des études ont montré qu'une exposition chronique à des PM_{2.5}, dès de faibles concentrations, était associée à un dysfonctionnement endothélial (Krishnan et al., 2012). De plus, il a été mis en évidence un lien entre une exposition à la pollution de l'air intérieur et le déclenchement de l'HTP et de l'insuffisance cardiaque droite (Bloomfield et al., 2014). D'autres études en Europe, ont mis en évidence que la pollution atmosphérique entraînait une augmentation de la pression artérielle pulmonaire majorant ainsi les risques de développer une HTP (Cai et al., 2016).

Ces études laissent donc penser qu'une exposition chronique à des NPs ou à des PUF pourrait déclencher ou exacerber les mécanismes responsables de l'HTP en particulier car les altérations moléculaires et cellulaires provoquées par une exposition aux particules sont retrouvées, également, dans l'HTP. Ces altérations sont détaillées dans la partie 4.

2. Écotoxicologie : les anguilles, poissons de fin de chaîne trophique

En écotoxicologie, l'étude des poissons de fin de chaîne trophique est particulièrement intéressante afin d'apprécier leur état physiologique suite à une alimentation potentiellement très contaminée, en plus de leur environnement aquatique pollué. Parmi les poissons de fin de chaîne trophique, nous nous sommes intéressés aux anguilles.

2.1. Les anguilles, poissons migrateurs

2.1.1. Présentation des anguilles

Les anguilles sont des poissons carnivores de fin de chaîne trophique vivant une grande partie de leur vie dans les cours d'eau douce. Dans les rivières, elles ont peu de prédateurs, si ce n'est l'Homme pour les consommer. Poissons mystérieux qui ont fait et font encore l'objet de nombreuses études, les anguilles se caractérisent par un cycle de vie très atypique qui aujourd'hui encore reste énigmatique sur plusieurs aspects, voire pas connu pour certaines espèces. Il existe en effet 19 espèces d'anguilles différentes réparties dans le monde entier. La plus connue étant l'anguille européenne, *Anguilla anguilla*. En Nouvelle-Calédonie, l'espèce retrouvée appartient à la famille des anguilles du Pacifique parmi lesquelles nous retrouvons les anguilles marbrées, *Anguilla marmorata*, encore très mal connue de nos jours. L'anguille marbrée est pourtant une des espèces les plus répandues au monde et est retrouvée dans toute la zone Indo-Pacifique comprenant l'Afrique, l'Inde, le Japon et les îles du Pacifique Sud (Nouvelle-Calédonie, Polynésie française, Australie, Nouvelle-Zélande, figure 25) où ce sont donc des poissons autochtones (Ege and Clark, 1985, Kuroki et al., 2009).



Figure 25 : Répartition géographique des *Anguilla marmorata*, carte adaptée de Daniel Dalet – images.com

L'*A. marmorata* tient son nom de sa partie dorsale qui est marbrée de brun-noir sur un fond gris-jaune. Cependant, cette pigmentation peut s'estomper au cours des années (figure 26). Les femelles peuvent atteindre 1,5 m de long et peser entre 3,5 et 9 kg contrairement aux mâles qui ne mesurent que 70 cm au maximum. En Nouvelle-Calédonie il ne s'agit pas d'une espèce protégée, mais classée « préoccupation mineure » par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature). Il n'y a donc aucune limitation concernant la pêche, ni en ce qui concerne les tailles minimales des poissons, ni par rapport au nombre de prises autorisées par jour par pêcheur.



Figure 26 : Anguille marbrée, *Anguilla marmorata*. D'après le document « anguille marbrée » de la DAVAR - 2014

2.1.2. Cycle de vie des anguilles

Les anguilles se caractérisent par leur cycle de vie très particulier et inhabituel. Il s'agit d'une espèce catadrome, c'est-à-dire qu'elle vit en milieu dulcicole mais se reproduit en milieu marin. Toutes les espèces d'anguille suivent les mêmes étapes de maturation mais les lieux de pontes et de migrations diffèrent en fonction des espèces.

La larve leptocéphale

Chaque femelle pond en moyenne 1.4 millions d'ovocytes, la fécondation est externe comme chez la majorité des poissons osseux. La zone de ponte des anguilles marbrées se situerait dans la région du courant équatorial nord (NEC) de l'ouest du Pacifique entre les îles Fidji et Samoa, ou bien, juste à l'Est de Tahiti mais il s'agit encore aujourd'hui d'hypothèses (Miller et al., 2002, Kuroki et al., 2006). Depuis cette zone, les larves seraient transportées vers l'ouest par le NEC qui se divise ensuite en deux autres courants, l'un vers le Nord (courant de Kuroshi) et l'un vers le Sud (courant de Mindano) qui permettront ainsi aux larves de rejoindre toutes les zones de l'Indo-Pacifique où sont retrouvées les anguilles marbrées (Kuroki et al., 2009). En Nouvelle-Calédonie, elles seraient amenées par le courant sud équatorial de Mindano. Les zones de pontes et le schéma des premières migrations de l'anguille marbrée semblent être relativement similaires avec l'anguille japonaise, *Anguilla japonica*, qui est quant à elle bien connue (Tsukamoto, 1992). Cependant, comme seules les anguilles marbrées sont retrouvées dans la zone Pacifique Sud, il existerait probablement un autre courant ou bien une autre zone de ponte plus spécifique à l'anguille marbrée (Kuroki et al., 2009). Les larves leptocéphales mettraient entre 7 à 12 mois à atteindre les zones côtières pour *A. anguilla*, en revanche pour *A. marmorata* cela reste une question en suspens mais le temps serait estimé entre 5 à 7 mois pendant lesquels elles parcourraient 1 500 km en moyenne (Bonhommeau et al., 2009, EndemiaNC, 2001, Feng-Yu et al., 2014). Durant cette première migration, les larves se nourrissent essentiellement de plancton et c'est une fois arrivées à proximité des côtes que les larves leptocéphales se métamorphosent en civelles transparentes (Tesch, 2003, Arai et al., 2002).

Le stade civelles

Les anguilles s'allongent et prennent une forme proche de leur forme adulte en devenant des civelles qui mesurent en moyenne 50 cm de long pour *A. marmorata*. À ce stade, les dents qu'elles avaient au stade de larve disparaissent et les civelles ne se nourrissent plus et jeûnent jusqu'au prochain stade (Tesch, 2003). Ce jeûne est rendu possible grâce aux réserves énergétiques accumulées durant la phase larvaire. Les civelles nagent alors le long des côtes afin d'atteindre puis d'envahir les embouchures de rivières entre octobre et avril en Nouvelle-Calédonie (EndemiaNC, 2001). Cette phase migratoire est dépendante des courants et du climat rencontré, en effet, les courants peuvent être un frein pour que les civelles puissent atteindre les rivières. Dans ces cas-là elles rejoignent le fond des eaux pour ne pas se faire entraîner en aval. Certaines civelles restent d'ailleurs au niveau des côtes où elles deviendront des anguilles adultes. Mais la majorité arrive à rejoindre les cours d'eau douce dans lesquels les civelles, n'étant plus soumises aux courants des océans, adoptent une nage active pour remonter les fleuves à contre-courant. Durant cette période, les civelles vont se pigmenter et reprendre une activité de nutrition. Elles correspondent au stade anguillettes. Elles vont prendre ensuite une coloration jaune pour devenir des anguilles jaunes, véritable stade de croissance de l'anguille (Durif, 2003).

L'anguille jaune

Le stade de l'anguille jaune constitue le plus long stade de la vie des anguilles et dure 8 à 20 ans. Durant cette phase, les anguilles changent de mode de vie et deviennent des espèces nocturnes, benthiques et solitaires. Cette phase est principalement axée autour de la recherche de nourriture qui va permettre aux anguilles jaunes de continuer leur croissance et de faire des réserves lipidiques importantes avant d'entamer une nouvelle migration pour se reproduire (Boetius and Boetius, 1980). Le régime alimentaire de l'anguille est très varié et elles se servent principalement de leur odorat pour traquer leurs proies. Les anguilles vont se nourrir de crevettes, de mollusques, d'insectes (libellules, moustiques) mais aussi d'autres poissons comme les gobies (lochons). Pendant sa croissance, l'anguille peut avaler quotidiennement jusqu'à 25 % de son poids afin de constituer des réserves de graisse car elle jeûne dès que la température descend au-dessous de 10°C ou dépasse 30°C (Van Ginneken and Maes, 2005). À savoir qu'en cas de fortes pluies ou de gros épisodes de pollution des cours d'eau, l'anguille peut alors se cacher dans les sédiments et jeûner en attendant que les conditions aquatiques soient plus favorables à la chasse.

A la fin de cette phase, les anguilles se métamorphosent à nouveau, cette fois-ci, en anguille argentée.

L'anguille argentée

L'anguille argentée *A. marmorata* se distingue de toutes les autres espèces d'anguillidés par sa couleur tachetée et la position de sa nageoire dorsale. Les adultes ont des marbrures brunes ou noires sur le dos sur un fond gris-jaune et un ventre blanc. Les marbrures sont moins visibles chez les jeunes spécimens (Froese and Pauly, 2004). Cette seconde métamorphose se caractérise surtout par des modifications anatomo-physiologiques afin que les anguilles soient prêtes à entamer une seconde migration pour rejoindre leur zone de ponte. Tout d'abord leurs yeux grossissent afin de se préparer à la vie marine dans les profondeurs et pour avoir une vision abyssale. Sa couleur devient plus foncée, sa peau s'épaissit et ses nageoires pectorales s'allongent (Tesch, 2003, Feng-Yu et al., 2014). Leur volume de muscle augmente également afin d'effectuer une migration efficace (Pankhurst, 1982). En ce qui concerne leur appareil reproducteur, les anguilles sont encore à ce moment-là à un stade pré-pubère même si le poids des gonades augmente légèrement chez les femelles qui sont au tout début de la vitellogenèse qui se poursuivra pendant leur migration (E. Burzawa-Gerard, 2008). L'appareil digestif subit également de grands changements, le tube digestif s'atrophie et l'anus se bouche.

Après cette métamorphose, les anguilles argentées quittent les cours d'eau vers l'aval afin de rejoindre le lagon calédonien puis l'Océan Pacifique pour entamer leur seconde migration.

La seconde migration : vers la reproduction

L'*A. marmorata* est ainsi prête à rejoindre la zone de ponte. Cette migration dure à nouveau entre 5 et 7 mois, période durant laquelle elle jeûne grâce aux réserves lipidiques accumulées dans les cours d'eau douce et elle mature ses gonades. La qualité des réserves énergétiques accumulées dans les eaux dulcicoles est donc déterminante pour que les anguilles puissent aller se reproduire (Pierron et al., 2008). Aujourd'hui nous ne savons pas tout à fait quels facteurs déclenchent cette seconde migration, cela pourrait être dû au climat, au cycle lunaire, aux conditions météorologiques ou encore aux saisons (Tesch, 2003). En ce qui concerne le métabolisme énergétique permettant ce jeûne, les réserves seraient catabolisées pour donner l'énergie nécessaire aux anguilles de nager, et 80 % de leur énergie disponible est sous forme de lipides.

Effectivement, l'eau et les protéines seraient progressivement transformées en lipides qui correspondent à 20 % de la masse totale des poissons (van Ginneken and van den Thillart, 2000). Ces réserves servent également à mûrir les gonades et finir la vitellogenèse chez les femelles, et ainsi, une fois arrivées dans la zone de ponte, les femelles pourront s'accoupler avec les mâles. Les anguilles meurent ensuite, suite à l'accouplement. Bien qu'elle n'ait jamais été observée, il semblerait que la reproduction ait lieu à des profondeurs de 400 à 700 mètres (Boetius and Boetius, 1980).

Les différents stades de vie de l'*A. marmorata* sont résumés sur la figure 27.

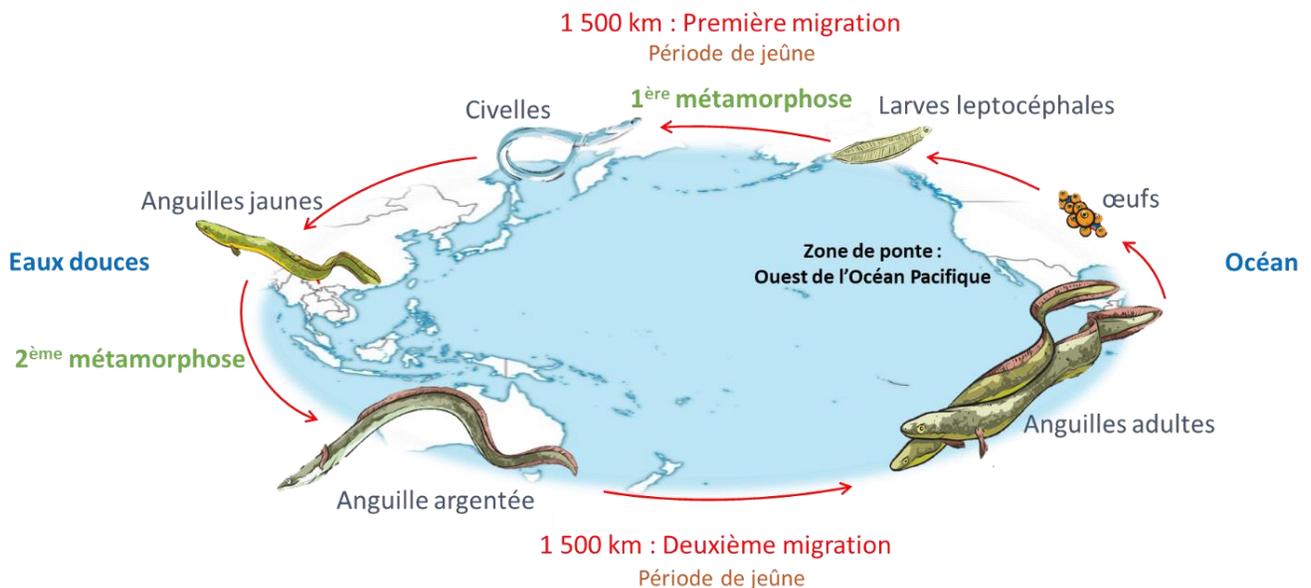


Figure 27 : Cycle de vie de l'anguille marbrée, adapté de British Sea Fishing

2.2. L'importance de la fonction hépatique

Le foie remplit trois fonctions vitales pour les poissons : la détoxification, la synthèse et le stockage. Ces fonctions lui permettent d'avoir un rôle clef pour éliminer les toxiques, métaboliser les protéines les glucides et les lipides (dont des protéines nécessaires à la reproduction) et constituer un réservoir de vitamines et de glycogène pour stocker de l'énergie.

2.2.1. La détoxification

Le foie va récupérer puis éliminer de nombreux toxiques, naturellement présents (déchets de l'organisme) ou apportés par l'environnement des poissons comme les métaux en excès. En effet, le foie des poissons va pouvoir détoxifier les métaux en les piégeant sur les métallothionéines

(MT) (Gonzalez et al., 2006). C'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle les foies d'anguilles concentrent des niveaux particulièrement élevés de différents métaux suite à une pollution des eaux (Usero et al., 2004, Turan et al., 2020). Il a, par ailleurs, été montré que le taux de MT chez les anguilles était un bon indicateur des taux de pollution des eaux. En effet les taux de MT sont toujours bien supérieurs chez les anguilles vivant dans des eaux polluées aux métaux par rapport à des anguilles vivant dans des cours d'eau non pollués (Linde et al., 2001). Par conséquent, la détermination des taux de MT hépatiques chez les anguilles pourrait être utile pour surveiller les réponses à l'exposition aux métaux et à la qualité de l'environnement. Idéalement, ces déterminations devraient être effectuées en tandem avec d'autres mesures d'effets sublétaux afin de maximiser les informations (Langston et al., 2002). Ainsi, l'accumulation de métaux, en particulier non essentiels, peut conduire à un dysfonctionnement hépatique car la capacité des MT à détoxifier va être vite saturée.

2.2.2. La synthèse et le stockage lipidique

Une des clefs de la réussite de la seconde migration des anguilles ayant pour but de se reproduire, est d'avoir une fonction hépatique saine, non altérée qui permet de stocker des lipides pendant la phase d'anguille jaune afin de les cataboliser en énergie durant la seconde migration. Les lipides peuvent être stockés dans différents tissus selon le type de poissons, mais chez les anguilles le foie est le principal organe de stockage lipidique (Sheridan, 1988b), dans lequel a lieu la lipogénèse et la lipolyse.

La lipogénèse regroupe l'ensemble des voies chimiques permettant la synthèse de graisses sous forme de triglycérides (trois acides gras, AG, et un glycérol - TG) à partir de nutriments (glucides et AG). Ces TG constitueront alors un stockage d'énergie dans les adipocytes des anguilles. En effet, après leur synthèse dans le foie, les TG sont transportés par des transporteurs VLDL (very low density lipoprotein) jusqu'au tissu adipeux (Lin et al., 1977, Henderson and Sargent, 1981). La lipolyse, à l'inverse de la lipogénèse, permet la dégradation des lipides pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP nécessaire aux poissons lors d'un jeûne prolongé ou d'un effort physique, telle qu'une migration. Lors de ces étapes, un organite en particulier joue un rôle majeur dans les hépatocytes : la mitochondrie. Une fois catabolisés, les TG vont fournir des AG qui vont rejoindre la matrice mitochondriale (structure mitochondriale commune aux poissons et mammifères décrite dans Partie 3, 1.1.2.) pour être hydrolysés en acétyl-CoA lors de la β -oxydation. L'acétyl-

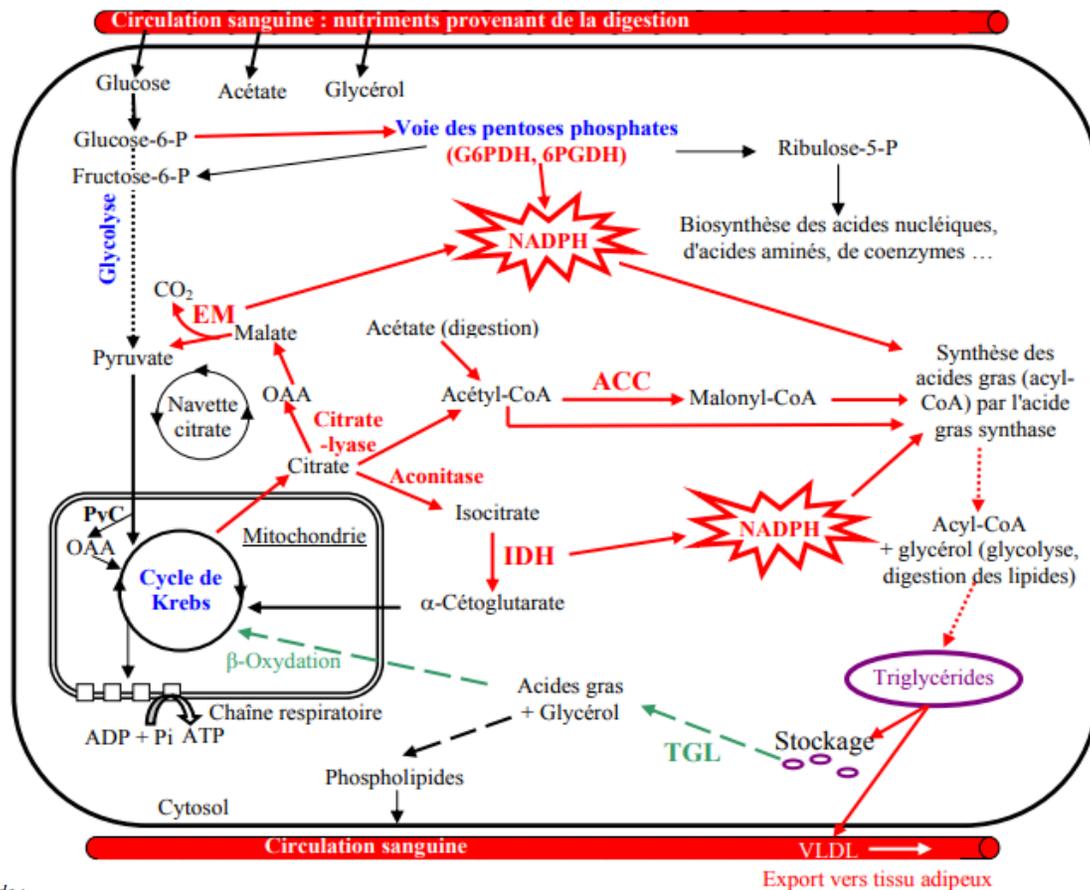
CoA formé va pouvoir rentrer dans le cycle de Krebs pour fournir les cofacteurs essentiels à la chaîne respiratoire mitochondriale, du NADH et du FADH₂, ce qui va permettre, *in fine* de fournir de l'ATP par phosphorylation oxydative. Quant au glycérol libéré lors de l'hydrolyse des TG, il peut soit être réutilisé comme précurseur de la synthèse des lipides ou du glucose (néoglucogenèse), soit rejoindre la voie de la glycolyse (Sheridan, 1988a, Sheridan, 1988b). De nombreuses enzymes interviennent alors dans la lipogenèse et la lipolyse mais nous présenterons uniquement celles étudiées dans notre travail à savoir l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la triglycéride lipase (TGL).

L'acétyl-CoA carboxylase : l'ACC catalyse une réaction considérée comme étape limitante de la lipogenèse. Tout d'abord, l'ACC provient de la digestion des AG et va permettre de produire du malonyl-CoA, ce qui nécessite de l'ATP. Le malonyl-CoA produit intervient ensuite à la fois dans la lipogenèse mais également dans la lipolyse, c'est-à-dire dans la β -oxydation des AG qui permet la production d'ATP. L'ACC est régulée par de nombreux facteurs :

- Régulation allostérique en fonction du régime alimentaire : un régime riche en glucides et pauvre en graisses stimulera l'ACC au contraire d'un régime riche en graisse ou d'un jeûne qui inhibera l'ACC (inhibition par l'acyl-CoA et stimulation par le citrate).
- Régulation covalente par le glucagon (phosphorylation, inactivation de l'ACC) et l'insuline (phosphorylation, activation de l'ACC).
- Régulation transcriptionnelle qui permet une augmentation ou une diminution de la quantité d'enzyme disponible qui peut être dû à des facteurs environnementaux comme l'action de certains métaux.

La triglycéride lipase : contrairement à l'ACC, la TGL n'est régulée que par les hormones (insuline et glucagon) ce qui lui permet, lorsqu'elle est active, de dégrader les TG en AG en utilisant une molécule d'ATP (Harmon et al., 1993) . La TGL est ainsi activée par phosphorylation initiée par le glucagon lors d'une période de jeûne. Au contraire l'insuline va déphosphoryler la TGL et l'inactiver.

Les deux voies métaboliques et les activités des enzymes décrites sont résumées sur la figure 28.



Légende :

G6PDH, glucose-6-phosphate-déshydrogénase

6PGDH, 6-phosphogluconate-déshydrogénase

EM, enzyme malique

ACC, acétyl-CoA-carboxylase

IDH, isocitrate-déshydrogénase

TGL, triglycéride-lipase

VLDL, "very low density lipoprotein" (transport des triglycérides dans le sang)

NADPH, nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (coenzyme des réductases de la lipogénèse).

OAA, Oxaloacétate

PyC, Pyruvate-carboxylase

→ Abondance énergétique, la cellule dispose de glucose et d'ATP en quantité suffisante. La biosynthèse des triglycérides peut avoir lieu. Cette dernière requière de l'acétyl-CoA et du NADPH (fourni par la navette citrate, la voie des pentoses phosphates et l'isocitrate-déshydrogénase).

→ Déficit énergétique, la voie de dégradation des lipides est stimulée.

Figure 28 : Schéma représentant l'implication des cellules hépatocytaires dans le métabolisme des lipides (lipogénèse et lipolyse)

D'après la thèse de Fabien Pierron, 2007. Pierron, 2007

2.2.3. Synthèse de la vitellogénine

Le foie est également le lieu de synthèse d'une protéine capitale pour la reproduction des anguilles : la vitellogénine. Il s'agit d'une lipoprotéine qui va subir plusieurs modifications post-traductionnelles au niveau hépatique lui permettant ensuite d'initier la vitellogenèse, étape pendant laquelle l'ovocyte incorpore la vitellogénine pour former des réserves lipidiques (le vitellus).

Tout cela se produit une fois que l'anguille argentée a entamé sa migration et commencé à jeûner.

La synthèse de la vitellogénine serait, en partie, déclenchée par l'œstradiol (E2) grâce à la présence d'un récepteur nucléaire spécifique de l'E2 sur les hépatocytes (Burzawa-Gerard et al., 1994). La reproduction chez les anguilles n'a jamais été observée mais plusieurs études ont réussi à montrer que juste avant de se métamorphoser, l'anguille jaune présente des taux plasmatiques élevés en E2, ce qui initierait la production de vitellogénine, qui est retrouvée dans le sang des anguilles argentées au tout début de leur migration. La vitellogénine est ensuite incorporée dans les ovocytes par endocytose après fixation à des récepteurs membranaires spécifiques (Westerlund et al., 2001). La maturation finale de la gonade débute ensuite, ce qui permettra à l'ovocyte d'être mature. Enfin, l'ovule mûr sera expulsé puis fécondé dans la zone des pontes des anguilles.

D'autres hormones sont bien sûr impliquées dans la vitellogenèse et la maturation des ovocytes dont la FSH et la LH, ainsi que l'hormone de croissance dont le rôle a été mis en évidence lors d'études *in vitro* sur des hépatocytes d'*A. japonica* (Kwon and Mugiya, 1994).

2.3. Les anguilles : certaines populations en déclin

En tant que poissons carnivores de fin de chaîne trophique, les anguilles sont particulièrement sensibles à de multiples types de pollution des eaux conduisant au déclin de leur population. En effet, pour l'espèce la plus connue, l'anguille européenne *A. anguilla*, nous constatons aujourd'hui que le stock de civelles a chuté de 90 % au niveau mondial depuis les années 1980, qui depuis est protégée par le Règlement Européen (Eur-Lex, 2007). Ce déclin est dû à de multiples facteurs, naturels ou anthropiques, communs pour toutes les espèces, tels que :

- Les changements climatiques et océaniques qui entraînent des modifications des courants côtiers pouvant altérer la migration des civelles. Dans l'Océan Pacifique il a d'ailleurs été montré que les années où El Nino (courant marin chaud de l'Océan Pacifique) sévissait, le nombre de civelles d'anguilles japonaises *A. japonica* diminuait considérablement (Westerberg, 1998).
- L'action de l'Homme par la pêche intensive (surtout des civelles) ou la détérioration de l'habitat (barrages, écluses, vannes...). Par exemple pour *A. anguilla* sur les 123 800 km² d'habitats adaptés à cette espèce, 33 % leurs sont inaccessibles (Moriarty and Dekker, 1997).

- Des maladies parasitaires menaçant les populations d'anguille comme le ver nématode *Anguillicola crassus* dans les années 1980.
- La pollution des eaux à de multiples toxiques tels que les pesticides comme le PCB (Polychlorobiphényle) ou les métaux.

Nous nous concentrerons uniquement sur les impacts de la pollution des eaux par les métaux dans cette partie.

2.3.1. Comment les anguilles peuvent-elles être exposées aux métaux ?

Pour rappel, les métaux, dont le Ni, peuvent être assimilés par deux voies chez les poissons, soit par la voie directe d'entrée, c'est-à-dire que la phase dissoute des métaux entre dans l'organisme par les branchies, soit par voie indirecte, c'est-à-dire par la voie trophique via la consommation d'espèces polluées, cela a été décrit en partie 1, paragraphe 2.3.2. Lorsqu'il s'agit d'un transfert direct, les concentrations en métaux les plus importantes seront retrouvées aux niveaux des branchies qui assimilent la phase dissoute des métaux alors qu'une contamination via la voie trophique sera plutôt responsable de concentrations en métaux importantes au niveau du foie et des reins. Aujourd'hui, de nombreuses études ont clairement établi le transfert entre les différents compartiments biologiques des polluants tels que les métaux, notamment à partir de la forme dissoute, mais aussi nanoparticulaire (Figure 29).

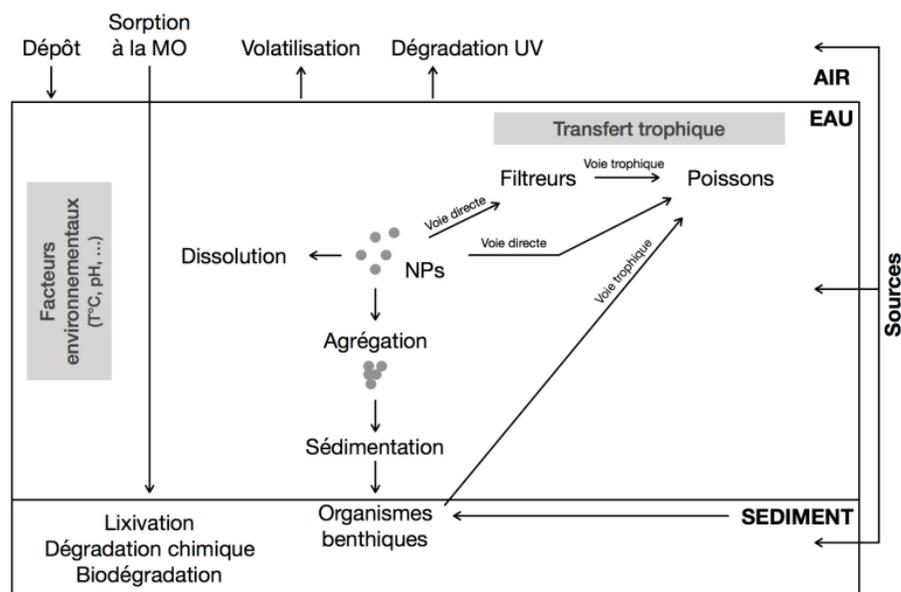


Figure 29 : Possibles voies de transfert des NPs dans l'écosystème aquatique, schéma de Perrier, 2018 , adapté de Walters et al., 2016

2.3.2. *L'impact d'une exposition des anguilles aux métaux*

En raison de leurs caractéristiques physiologiques spécifiques, les anguilles sont particulièrement sujettes à la bioaccumulation de contaminants, en particulier des métaux. Les études suggèrent que de faibles niveaux de certains métaux ont le potentiel d'affecter le développement, la reproduction et le comportement des poissons, notamment par sa place dans la chaîne alimentaire. Les anguilles sont aujourd'hui connues comme étant de bons bio-indicateurs de l'état de pollution des rivières aux métaux qu'elles accumulent en consommant des espèces ayant déjà assimilé les différents métaux (van der Oost et al., 2002).

Le déclin des populations pourrait s'expliquer par des altérations morphométriques et des dysfonctionnements des paramètres métaboliques notamment dus au stress oxydant, à la perturbation des mitochondries et à l'activation de facteurs cancérigènes. Dans la plupart des cas, les métaux n'entraînent pas de mortalité directe, mais provoquent des effets sublétaux.

Par exemple, la contamination des anguilles au Cd est aujourd'hui bien documentée. Une exposition chronique des anguilles jaunes au Cd entraînerait des altérations structurelles et fonctionnelles des branchies (Gony, 1990) ; une altération de certains canaux transmembranaires au niveau des intestins (Lionetto et al., 1998), une perturbation du métabolisme lipidique dans le foie (Pierron et al., 2007) et une altération de la maturation des gonades qui *in fine* impacte la reproduction des anguilles (Pierron et al., 2008). Toutes ces altérations sont dues au fait que le Cd est retrouvé en concentrations importantes dans ces organes (branchies, foie, intestins) mais également dans les reins (Pierron et al., 2008), l'organe de l'épuration des toxiques.

Le Cu quant à lui est documenté en tant que toxique sanguin chez les anguilles en interagissant avec les protéines sanguines (augmentation des taux de cortisol et des lactates dans le sang) (Teles et al., 2005, Oliveira et al., 2008). Cette toxicité sanguine est également retrouvée après une exposition des anguilles au mercure (Hg) avec une cytotoxicité au niveau des lymphocytes et une phosphorylation des protéines sanguines (Carlson and Zelikoff, 2008).

L'exposition aux métaux, surtout aux métaux non essentiels, va donc entraîner une perturbation du système immunitaire, de la reproduction, du système nerveux et du système endocrinien, ce qui entraîne des perturbations physiologiques, une diminution de la résistance aux infections, un trouble de la reproduction et enfin, une diminution de la qualité de vie pouvant aller jusqu'à la mort de l'anguille (Geeraerts and Belpaire, 2010, Gauthier et al., 2009, Buttermore et al., 2018). Sur les 30 dernières années, les études ont surtout montré une diminution plus ou moins

simultanée des espèces d'anguille de l'Hémisphère Nord (*A. Anguilla*, *A. rostrata* et *A. japonica*), ce qui constitue un argument en faveur de l'idée que certains contaminants, dont les métaux, sont en lien direct avec le développement rapide de l'industrialisation dans le monde et pourraient être considérés comme des éléments clés dans le déclin de l'anguille. En ce qui concerne l'*A. marmorata*, il n'y a aujourd'hui aucune étude qui établit clairement quelle est l'évolution de cette espèce dans l'Océan Pacifique, c'est également pour cela que nous nous y intéressons. De plus, il n'existe aujourd'hui que peu, ou pas, d'études sur l'impact d'une exposition au Ni chez cette espèce.

Afin de lutter contre ce déclin, l'Europe a mis en place des réglementations, et la France a établi un plan de protection des anguilles qui consiste à lutter contre la pêche illégale, la pollution et les obstacles à la circulation des poissons (barrages). Ce plan mené par l'OFB (Office français de la Biodiversité) organise également des relevés de pollution et effectue des mesures biométriques pour suivre les espèces. Rappelons que la Nouvelle-Calédonie s'est engagée à suivre les recommandations Européennes en attendant d'en avoir des spécifiques à l'archipel, mais ne s'est pas engagé ni à la protection de l'anguille, ni sur la stratégie de biodiversité qu'elle souhaite cependant mettre en place.

2.3.3. Le foie : organe cible de la toxicité des métaux

Comme expliqué dans le paragraphe 2.2, le foie a un rôle central dans la réponse à la contamination aux métaux chez les poissons, et surtout chez les anguilles. Les métaux (Cd, Hg, Ni...) sont très souvent trouvés à de très fortes concentrations dans les foies des anguilles généralement de façon corrélée à la concentration en métaux dans les rivières (Usero et al., 2004, Barak and Mason, 1990). Le foie est un organe bioaccumulateur notamment pour son rôle dans la détoxification des métaux (paragraphe 2.2.1). Néanmoins, l'accumulation de métaux au niveau hépatique peut conduire à un dysfonctionnement de l'organe affectant potentiellement l'achèvement du cycle de vie du poisson. Effectivement, le foie a un rôle clef dans le processus d'argenture (2^{ème} métamorphose) des anguilles. Cette métamorphose ne peut avoir lieu que si une quantité suffisante d'énergie est stockée sous forme de TG (paragraphe 2.2.2), cela sous-entend que sous une certaine quantité de masse grasse accumulée au stade d'anguille jaune (environ 28 %), l'argenture ne peut être initiée (Thurrow, 1959, Larsson et al., 1990). Il a également été estimé que la quantité totale de TG stockés doit dépasser 20 % de la masse corporelle pour

couvrir les besoins énergétiques lors de la migration de l'anguille femelle (Boetius and Boetius, 1980). Ainsi, les anguilles ayant moins de 13 % (du poids corporel) de graisse ne seraient pas capables de nager, sachant qu'un supplément de 7 % (du poids corporel) est nécessaire pour la maturation des ovocytes. Sachant cela, plusieurs auteurs ont décrit les effets négatifs de certains métaux sur le métabolisme lipidique de l'anguille impactant ainsi l'efficacité du stockage lipidique des anguilles jaunes, comme pour le Cd qui altère l'activité et le niveau d'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la lipolyse et la lipogénèse du foie avec une induction de la TGL et une répression de l'ACC suggérant une augmentation de la consommation des graisses. Ces études montrent qu'une exposition au Cd altère le stockage des TG en les surconsommant, ce qui pourrait compromettre le succès de la reproduction pour laquelle il n'y aurait plus assez de stocks de TG (Pierron et al., 2007, Pierron, 2007).

Des altérations histologiques des hépatocytes d'anguille des marais marbrée (*Synbranchus marmoratus*) ont été rapportés après une exposition au Cu avec une dissolution de la membrane hépatocytaire, une dégénérescence vacuolaire et une infiltration de cellules inflammatoires dans le foie. Le dysfonctionnement hépatique induit par le Cu a été confirmé par l'augmentation des activités des enzymes marqueurs d'une altération hépatique, la glutamate oxaloacétate transaminase et la glutamate pyruvate transaminase (Liu et al., 2021). Plusieurs auteurs supposent que les premiers mécanismes à l'origine de dommages hépatiques chez les anguilles après une exposition aux métaux résultent du stress oxydant généré (détaillé en partie 4, paragraphe 1.1) avec une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes et une production d'ERO (Nunes et al., 2014, Sow et al., 2013).

L'indice hépato-somatique des anguilles, c'est-à-dire le poids du foie rapporté au poids total de l'individu, est également un marqueur de bon ou mauvais état physiologique du poisson reflétant l'état de la fonction hépatique, donc, de sa capacité à bien synthétiser les enzymes nécessaires au métabolisme lipidique et à la reproduction. Cet indice est généralement plus faible lorsque les anguilles sont exposées aux métaux, ce qui pourrait expliquer la perte de fonction du foie dans la synthèse et le stockage de protéines (Barak and Mason, 1990, Baillon et al., 2015).

En conclusion de cette partie, les modèles utilisés dans cette Thèse nous paraissent pertinents pour plusieurs raisons. Tout d'abord en toxicologie humaine, les CE, qui jouent un rôle majeur dans la circulation pulmonaire et sont connues comme étant une cible des NPs, restent peu

étudiées alors qu'il est connu qu'une dysfonction endothéliale peut conduire au déclenchement ou à l'exacerbation de l'HTP notamment. En effet, au vu du mécanisme de toxicité des NPs qui sera détaillé dans la partie suivante, une exposition par inhalation de la population aux NPs peut déclencher ou exacerber l'HTP notamment via la génération d'un stress oxydant, d'une inflammation, d'une dérégulation de l'homéostasie calcique, d'une altération de la production des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs et d'une perturbation mitochondriale, autant d'évènements critiques retrouvés dans l'HTP. En écotoxicologie, travailler sur des poissons de fin de chaîne trophique est particulièrement pertinent notamment par le fait que ce sont des organismes vertébrés plus évolués que ceux de la base du réseau trophique (en terme de détoxification et de métabolisation), et, potentiellement consommés par l'Homme. Parmi ces poissons, l'anguille marbrée est particulièrement sensible à la contamination des eaux par les métaux, en particulier par sa longue durée de vie en eau douce et son cycle de vie si particulier. De plus, il est aujourd'hui connu que ce sont des poissons dont certaines espèces sont en déclin. Parmi toutes les causes avancées, la pollution des eaux pourrait jouer un rôle important. De plus, ce déclin des populations d'anguilles pourrait être dû aux effets toxiques des métaux sur la fonction hépatique, essentielle pour la migration de reproduction des anguilles, et, aujourd'hui, les anguilles marbrées restent une espèce très peu étudiée en écotoxicologie.

Nous allons maintenant voir dans la partie 4 pourquoi les PUF et les NPs sont particulièrement toxiques pour les cellules.

Partie 4 : Pourquoi les PUF et NPs sont-elles toxiques ?

1. Toxicité des PUF et des NPs

La toxicité des PUF et des NPs dépend de multiples facteurs, notamment, de leur source, de la durée d'exposition, de la susceptibilité individuelle ; et surtout de leurs propriétés physico-chimiques (taille nanométrique, forme, solubilité, photo réactivité, réactivité de surface, composition chimique ou charge) (Pascal Andujar, 2008).

1.1. La notion de réactivité de surface

La réactivité de surface est une caractéristique très importante qui conditionne fortement la toxicité des PUF et des NPs. En effet, à masse égale, la surface des particules ultrafines, qui possèdent un faible diamètre, est plus importante que celle des particules fines ou grossières. Pour une même masse, les PUF et les NPs ont une surface de réaction proportionnellement plus importante que des $PM_{2.5}$ ou des PM_{10} . Cette caractéristique leur confère une grande capacité d'interaction par la présence de nombreux sites d'adsorption. Par exemple, des nano-oxydes de Fe de 6 nm de diamètre peuvent retenir 10 fois plus d'ions en surface que des particules d'oxydes de Fe de 300 nm (Auffan, 2007) (figure 30). Cela influe directement sur leur toxicité, en effet, il a été montré que les NPs d'Ag de 18 et 34 nm induisaient une cytotoxicité plus importante que les NPs d'Ag de 60 et 160 nm chez des rats exposés par inhalation (Braakhuis et al., 2016). L'activité biologique augmente ainsi considérablement lorsque la taille des NPs diminue.

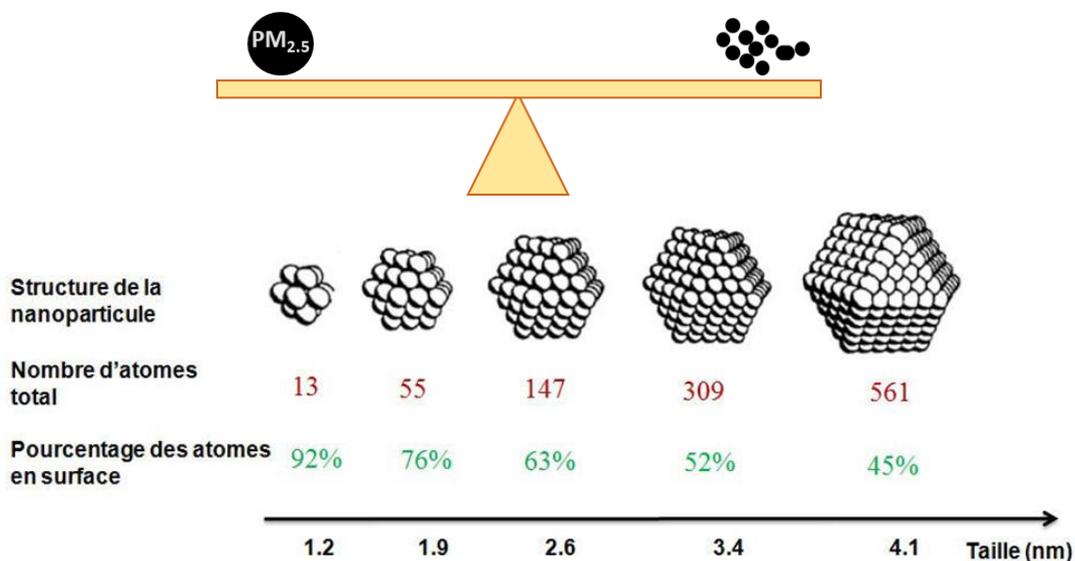


Figure 30 : Réactivité de surfaces des NPs en fonction de leur taille, adapté de Aiken and Finke, 1999

Les différentes études actuelles laissent supposer que les mécanismes d'adsorption à la surface des PUF et des NPs sont différents des mécanismes classiques qui se produisent à la surface des PM_{2.5} ou des PM₁₀. Cependant, la nature de ces mécanismes reste encore mal connue. Des suppositions émergent, néanmoins, pour expliquer ce phénomène d'adsorption comme résultant, d'une part, d'une modification structurale de la surface des particules lorsque la taille diminue (Auffan, 2007) et, d'autre part, de la facilité avec laquelle les particules individuelles s'agrègent (Shin et al., 2015). Les particules métalliques et d'oxydes métalliques tels que le Ni ou le NiO ont des propriétés électroniques spécifiques leur permettant d'avantage d'interagir avec leur environnement biologique, surtout avec les électrons libres et les protéines. Dans le milieu aquatique, les PUF et les NPs sont d'avantage soumises à des paramètres influençant leur comportement comme le pH, la salinité de l'eau ou encore la présence de micro-organismes et de matière organique comme décrit dans la partie 2 en 2.3.2 (von der Kammer et al., 2010, Majumdar et al., 2016a, Majumdar et al., 2016b). En revanche, dans le milieu biologique, les PUF et les NPs vont surtout être influencées par le pH des compartiments biologiques ainsi que par la voie d'administration. En effet, par voie inhalée, les PUF et les NPs passent d'une distribution en phase gazeuse à une distribution en phase liquide une fois arrivées dans le système respiratoire et cardiovasculaire via les fluides respiratoires. Tous ces phénomènes influent directement sur leur réactivité de surface et pourraient expliquer que les mécanismes de toxicité puissent différer en fonction de la voie d'administration ou du compartiment biologique cible (Gliga et al., 2014, Qiao et al., 2015). Par exemple, les doses toxiques diffèrent en fonction des espèces concernant les NPs d'Ag qui semblent plus toxiques chez les poissons zèbres après exposition dans l'eau, en comparaison aux rats exposés par inhalation (Du et al., 2018). La réactivité de surface est ainsi un paramètre essentiel dans la capacité des PUF et des NPs à générer, par la suite, un stress oxydant dans les cellules.

1.2. Le stress oxydant

En raison de leurs propriétés physico-chimiques, de nombreuses études ont montré que les PUF et les NPs entraînaient un stress oxydant qui se définit comme un déséquilibre entre la production d'ERO et d'enzymes anti-oxydantes en faveur soit, d'une surproduction d'ERO, soit d'une diminution de la capacité anti-oxydante des enzymes (Marano et al., 2011, Oberdorster et al.,

2005). La génération d'ERO dépend directement des interactions entre les PUF et les NPs et l'environnement biologique dans lequel les particules sont présentes (figure 31).

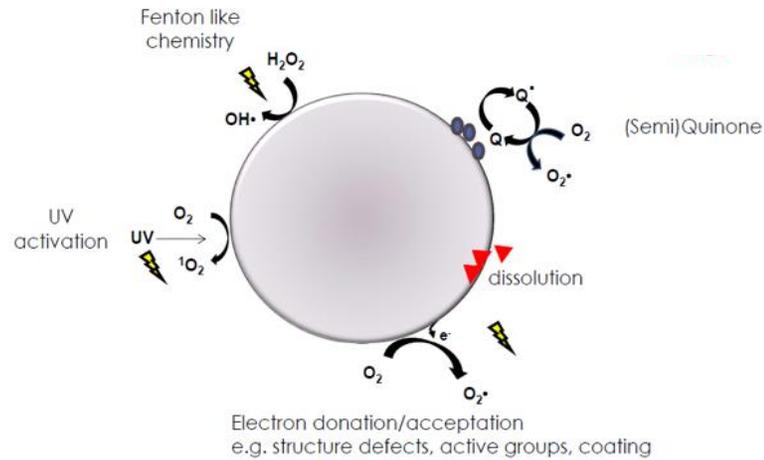


Figure 31 : Réactivité de surface des NPs . Adapté de Hellack et al., 2017

Parmi les ERO, il y a des oxydants non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et des oxydants radicalaires, c'est-à-dire électroniquement instables, comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$) notamment. Comme décrit dans le paragraphe précédent (partie 1, paragraphe 1.1), la réactivité de surface et les caractéristiques physico-chimiques des PUF et des NPs vont conditionner leur capacité à former des ERO. Il existe différentes sources d'ERO dans les cellules (Cadenas and Davies, 2000, Lassegue et al., 2012, Sies et al., 2017) :

- **Les mitochondries** : source importante d'ERO, surtout d' $O_2^{\cdot-}$ qui est produit au niveau de la CRM lors des réactions des complexes I et III. Au moment du transfert d'électrons, le dioxygène (O_2) est réduit en eau (H_2O) et en ERO (figure 32).

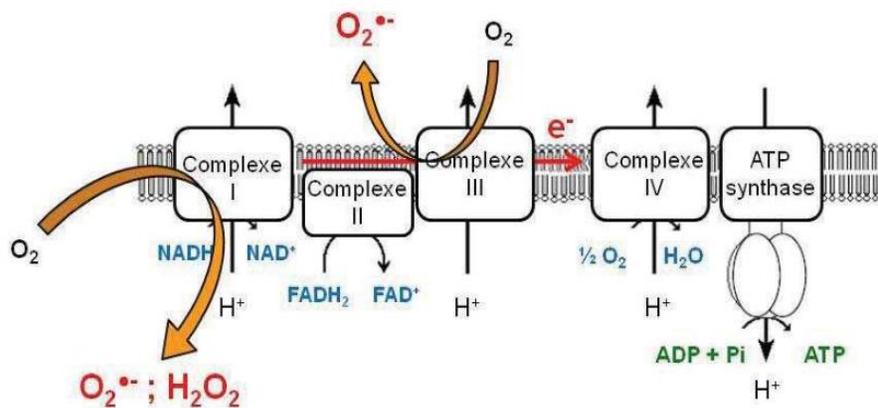


Figure 32 : Chaîne respiratoire mitochondriale, schéma issu de la thèse de Cyril Dégletagne, 2012

- **La NADPH oxydase** : rôle important dans le système de défense cellulaire et de signalisation à l'origine de la production de l' H_2O_2 à partir d' O_2
- **Les xanthines oxydases** : production d'ERO radicalaires et non radicalaires lors du catabolisme des bases puriques
- **La 5-lipo-oxygénase** : au niveau du RE surtout via les cytochromes lors du métabolisme des xénobiotiques

En dehors des ERO, il existe également les espèces réactive de l'azote (ERN) tel que le NO. Celui-ci réagit avec l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ pour former des nitrites et des nitrates puis des peroxynitrites (ONOO^-). Les peroxynitrites sont des espèces réactives particulièrement toxiques et retrouvées dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires et respiratoires dont l'HTP (Pacher and Szabo, 2006). Les PUF et les NPs d'oxydes métalliques sont particulièrement toxiques en raison de leur grande capacité à générer des ERO et en particulier des ERO radicalaires via la réaction de Fenton en faisant intervenir du Fe^{2+} (Abdal Dayem et al., 2017, Ivask et al., 2015) (figure 33). En effet, le Ni^{2+} à l'état d'ion libre va pouvoir catalyser la réduction de l' H_2O_2 conduisant directement à la production d'ERO radicalaires (Torreilles and Guerin, 1990).

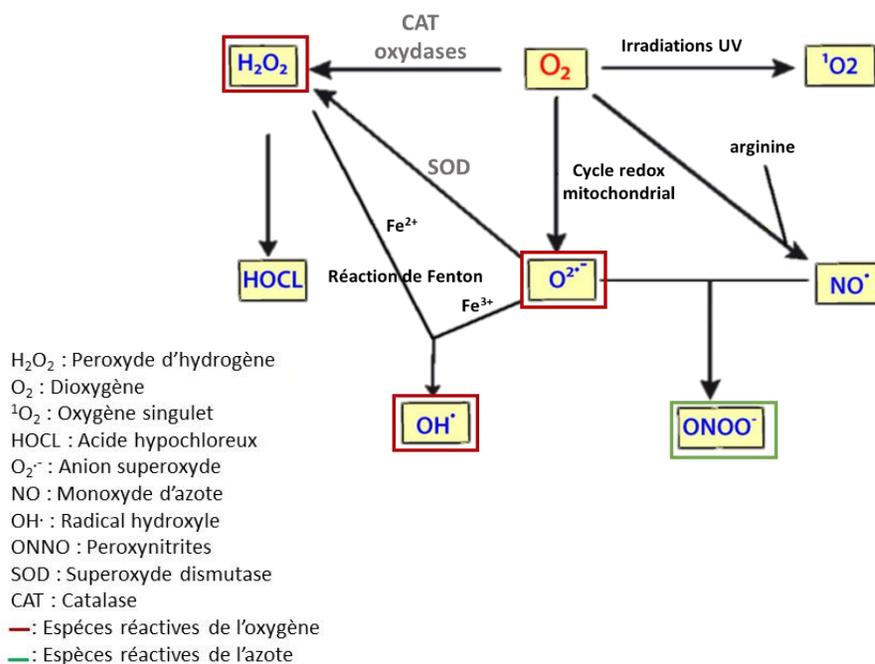


Figure 33 : Production des ERO et ERN.

Produits en grande quantité, les ERO vont donc avoir des effets délétères pour la santé, mais leur production est régulée par un système de défense antioxydant afin de maintenir une certaine homéostasie cellulaire. Pour une faible production d'ERO, le système antioxydant se met en place notamment via la voie du Nrf2 qui active la transcription d'enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), ou encore l'hème oxygénase-1 (HO-1). Ce système de défense permet de maintenir un équilibre redox dans la cellule. En cas de production trop importante d'ERO intracellulaires, le système de défense n'est plus en capacité de maintenir cet équilibre.

Il est aujourd'hui démontré que les NPs, en particulier les NPs métalliques interagissent directement avec les enzymes anti-oxydantes et peuvent changer leurs conformations (Zhang et al., 2019) ce qui conduit à une diminution de l'activité de ces dernières, voire une inactivité. Ces changements ont a priori lieu en phase post-transcriptionnelle car une augmentation de la transcription des SOD et des CAT est rapportée dans plusieurs types cellulaires humains (cellules endothéliales) et de poissons (hépatocytes de truites) avant de voir que leur activité est pourtant diminuée (Cao, 2018, Massarsky et al., 2014, Wang et al., 2016, Hao et al., 2009).

Les ERO sont à l'origine de nombreux dommages cellulaires et ont pour principales cibles l'ADN, les protéines ainsi que les lipides membranaires. Elles induisent des phénomènes de génotoxicité par l'oxydation de l'ADN, des atteintes protéiques et enzymatiques et enfin des peroxydations des lipides (Sies et al., 2017). Une forte production d'ERO peut ensuite déclencher les voies de l'inflammation puis conduire à la mort des cellules (Nel et al., 2006) (figure 34).

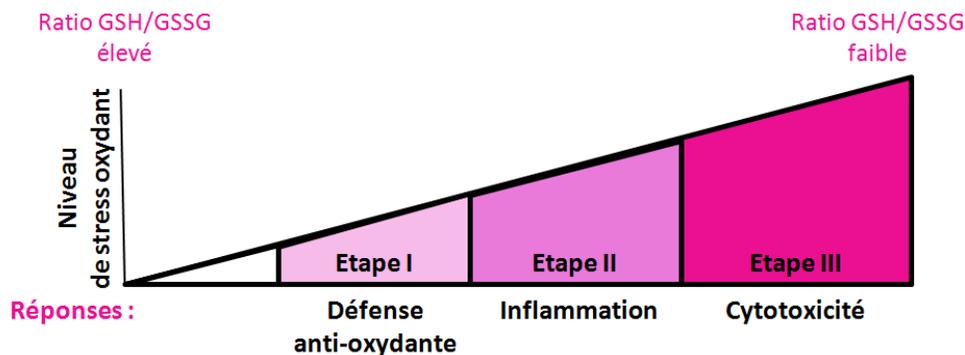


Figure 34 : ERO et stress oxydant. Adapté de Nel et al., 2006

Le stress oxydant a, à la fois, un rôle important dans le déclenchement de pathologies cardiovasculaires, telle que l'HTP où une surproduction d'ERO est observée sur des modèles *in vivo* de souris (Freund-Michel et al., 2013), mais également dans l'altération de la qualité de vie des anguilles chez lesquelles une production d'ERO est rapportée dans tous les organes en contact avec des métaux (branchies, foie, intestins, reins, muscles) (Ahmad et al., 2006, Pierron et al., 2009, Gonzalez et al., 2006).

1.3. L'inflammation

La signalisation redox contrôle de nombreuses fonctions biologiques en activant ou inhibant différentes voies métaboliques. En cas de surproduction importante d'ERO la voie NF- κ B est activée et entraîne la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation et l'immunité. Cette voie est activée grâce à l'affinité qu'ont les ERO pour les résidus de cystéines qui composent ce facteur nucléaire (Sies et al., 2017). Cette activation va ainsi provoquer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 ou encore le TNF α (Zhang et al., 2012). Dans ce travail nous nous intéressons en particulier à l'IL-6, notamment car elle est sécrétée lors de la phase aiguë de l'inflammation, c'est à dire assez rapidement après une surproduction d'ERO.

Chez l'Homme

L'IL-6 est une cytokine retrouvée notamment dans l'HTP chez l'Homme. De plus, cette cytokine est sécrétée de manière importante après une exposition aux particules atmosphériques. Il a été observé dans des HPAEC, après une exposition à des PUF, une augmentation de la sécrétion de cette cytokine (Karoly et al., 2007) qui contribue ainsi à la physiopathologie de la maladie (Rafikova et al., 2019). Elle active notamment la différenciation des monocytes en macrophages et inhibe la maturation des cellules dendritiques contribuant au remodelage de l'endothélium.

Chez le poisson

Chez les poissons, les interleukines constituent le plus grand groupe de cytokines existant et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée et acquise du poisson. C'est intéressant de noter que parmi les interleukines, l'IL-6 a un rôle clé et crucial dans le processus immunitaire en contrôlant la différenciation des cellules de l'immunité, ce qui permet aux poissons, dont les anguilles, de se défendre contre diverses infections et pathogènes (Zhu et al.,

2016, Castellana et al., 2008). Cependant, il faut noter que les fonctions précises de l'IL-6 dans la réponse immunitaire des poissons est encore mal comprise.

1.4. L'homéostasie calcique

Une altération de l'homéostasie calcique est souvent observée après qu'un stress oxydant soit généré après une exposition aux PUF et aux NPs métalliques. Cependant, les mécanismes cellulaires et biologiques impliqués dans cette altération sont très variables suivant le type de particules et le type cellulaire.

Chez l'Homme

De précédentes études, réalisées notamment au CRCTB, ont montré que l'exposition d'artères intra pulmonaires à des NPs, entraîne une modification de la réactivité vasculaire (Courtois et al., 2010, Ying et al., 2013) via une perturbation de la signalisation calcique. Plusieurs hypothèses sont émises. Les PUF et les NPs pourraient, d'une part, entraîner une perturbation de l'homéostasie calcique via la peroxydation lipidique induite par les ERO et, d'autre part, interagir directement ou indirectement avec les canaux calciques membranaires, en particulier les ions libres notamment les formes d'ions divalents comme le Ni^{2+} relargués à partir des particules (Deweirdt et al., 2020, Gordeeva et al., 2003). Plusieurs auteurs supposent que dans les cellules vasculaires, les canaux TRPs (TRPV4 dans les CE) sont sensibles à l'exposition aux métaux et seraient inhibés par ces derniers rendant ainsi les canaux non fonctionnels pour restaurer l'homéostasie calcique. Les sels de nickel tels que le chlorure de nickel sont d'ailleurs des bloqueurs des canaux TRPs (Cortijo et al., 2010). L'interaction entre les PUF et les NPs, et les canaux calciques, serait donc à l'origine d'un dysfonctionnement vasculaire (Sanchez et al., 2017).

Chez les poissons

Le stress oxydant généré peut avoir de multiples conséquences dans plusieurs organes, notamment via une altération de l'homéostasie calcique qui peut entraîner des dysfonctions physiologiques dans des organes tel que le foie. En effet, une altération de la signalisation calcique dans les hépatocytes peut générer une altération de la fonction mitochondriale, fonction calcium dépendante pour la phosphorylation oxydative ou encore le bon fonctionnement de la CRM, de la lipolyse et de la lipogenèse (Madreiter-Sokolowski et al., 2020). Il est souvent observé une

augmentation du calcium dans les mitochondries ou le RE des hépatocytes de poissons, ce qui conduit à des altérations histologiques et fonctionnelles. Ces différents mécanismes peuvent être à l'origine du déclenchement de pathologies hépatiques comme rapporté, notamment, chez la truite et l'anguille (Fabbri et al., 1998, Amaya and Nathanson, 2013).

1.5. Dysfonction mitochondriale et apoptose

La cytotoxicité des particules atmosphériques commence à être bien documentée. D'une manière générale, de nombreuses études *in vitro* ont montré une augmentation dose-dépendante de la cytotoxicité des particules atmosphériques sur différents types cellulaires (cellules respiratoires, cellules vasculaires, CML, cardiomyocytes...). Les particules d'oxydes métalliques entraînent une mort cellulaire par la voie de l'apoptose. L'apoptose est une forme hautement régulée de mort cellulaire programmée, qui est, également, médiée par des signaux intra et extracellulaires mais également par le taux d'ERO généré. De nombreux facteurs de stress environnementaux (polluants, xénobiotiques) sont connus pour induire la mort cellulaire par apoptose et contribuer, ainsi, à diverses pathologies. La production d'ERO et la sécrétion de cytokines inflammatoires peuvent, notamment, induire la mort cellulaire par apoptose (Elmore, 2007).

L'apoptose est en premier lieu initiée par une dysfonction des mitochondries, et ce, quel que soit le type cellulaire. De nombreuses études ont montré que, après internalisation, les PUF et les NPs sont souvent localisées, dans des vacuoles cytoplasmiques à proximité des mitochondries ce qui peut engendrer des interactions plus ou moins directes avec cet organite et induire des dommages structurels (Li et al., 2003, Foley et al., 2002). Ces altérations mitochondriales peuvent être à l'origine d'un important stress oxydant mitochondrial à l'origine d'une modification de l'homéostasie calcique mitochondriale. Les ERO, notamment l' $O_2^{\cdot-}$, peuvent induire une lipoperoxydation de la membrane mitochondriale à l'origine d'une baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Cadenas and Davies, 2000). Toutes ces altérations vont ensuite déréguler la CRM, la β -oxydation, le métabolisme lipidique et entraîner une dysfonction mitochondriale et une activation des mécanismes de l'apoptose (Prakash et al., 2017, Kroemer et al., 2007). Il existe deux voies principales initiatrices de l'apoptose :

- **La voie extrinsèque** : médiée par les récepteurs de la mort à la surface de la cellule (protéines transmembranaires).

- **La voie intrinsèque** : médiée par les mitochondries, qui est contrôlée par plusieurs facteurs de la famille des protéines bcl-2 : *bax*, *bak* et *bcl-2*. *Bax*, une fois activé par p53, va entraîner la libération du cytochrome c (CytC) par la membrane interne de la mitochondrie qui est devenue perméable aux molécules (PM < 1500 Da). Le CytC va alors se lier à une molécule adaptatrice, APAF-1. Une fois la liaison établie dans le cytoplasme, le complexe va ensuite activer les caspases qui sont des molécules effectrices de l'apoptose. La principale caspase initiatrice qui s'auto active est la caspase 9 qui forme avec le complexe CytC-APAF-1 un oligomère appelé apoptosome. Ce dernier va ensuite activer d'autres caspases (3 et 7) qui font entrer la cellule dans un processus irréversible de mort cellulaire avec des altérations membranaires, cytoplasmiques et nucléaires. En effet, de nombreuses modifications morphologiques sont observables telles qu'une invagination de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine le long de l'enveloppe nucléaire puis une fragmentation nucléaire et cellulaire qui va libérer les corps apoptotiques formés (Fink and Cookson, 2005).

Les PUF et NPs peuvent déclencher la voie de l'apoptose par différentes voies résumées dans les figures 35 et 36 :

- Altération directe de la mitochondrie
- Inhibition directe ou indirecte via les ERO du facteur anti-apoptotique *bcl-2* et activation du facteur pro-apoptotique *bax*
- Oxydation de l'ADN par les ERO qui peut activer la voie de signalisation p53

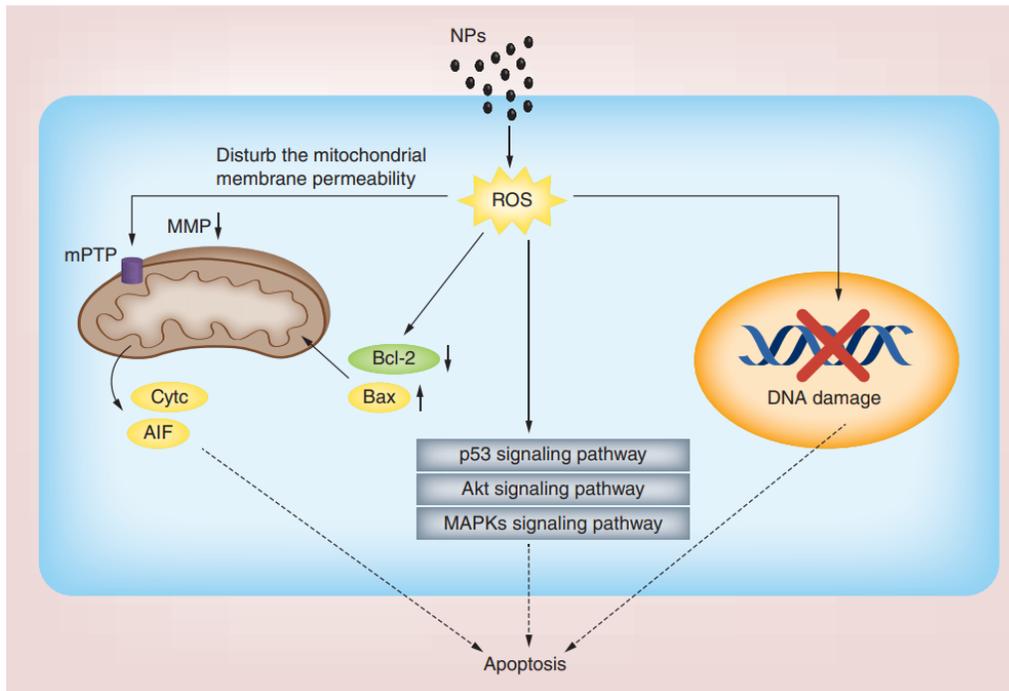


Figure 35 : Les NPs peuvent activer les ROS pour entraîner l'apoptose par trois voies différentes, d'après Chen et al. 2003

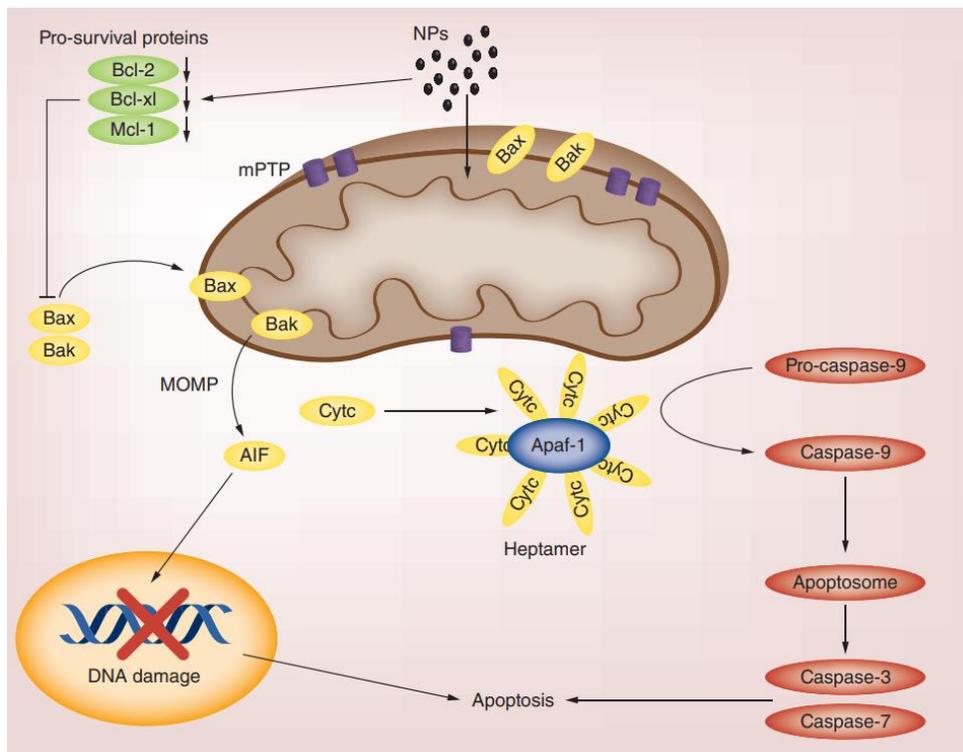


Figure 36 : Les NPs peuvent endommager directement les mitochondries entraînant une augmentation de l'expression de Bax et Bak et une diminution de l'expression de Bcl-2, ce qui favorise la formation d'un pore de transition de perméabilité mitochondriale par lequel Cytc est libéré dans le cytoplasme et forme l'apoptosome avec Apaf-1. D'après Chen et al. 2003.

2. Toxicité des particules de nickel

L'exposition des populations et des espèces aux ETM dont le Ni en Nouvelle-Calédonie est un vrai problème de santé publique et environnementale mais peu d'études ont été réalisées pour vraiment mettre en avant les risques et conséquences d'expositions de la population et des espèces naturelles à ces métaux. C'est dans ce contexte que le CNRT-Nickel créé en 2007 vise à soutenir la recherche fondamentale et appliquée dans 3 axes thématiques : Nickel et Technologie ; Nickel et Société et Nickel et Environnement naturel. En effet, en faisant partie des 25 zones prioritaires « hot spot » pour la préservation de la biodiversité terrestre planétaire en particulier car 80 % des espèces présentes sur les terrains miniers sont endémiques, il paraît essentiel de protéger cet archipel des risques de la surexploitation minière. Le CNRT-Nickel a ainsi pour objectif la mise en commun et la gestion de moyens pour réaliser des programmes de recherche ou de développement technologique, pour une exploitation durable des ressources minières, compatible avec la préservation de l'environnement naturel et humain de la Nouvelle-Calédonie. Notre travail fait partie de l'axe « Nickel et Environnement naturel » pour notre partie d'écotoxicologie en faisant partie intégrante du projet QUAVAR¹. Ce projet a pour but de connaître le bruit de fonds géochimique des cours d'eau des milieux ultramafiques, réaliser des tests d'écotoxicité sur des organismes dulçaquicoles indigènes, définir des standards de qualité pour les organismes de la colonne d'eau et des sédiments, et, dériver une norme de qualité environnementale.

Le CNRT-Nickel est ainsi, aujourd'hui, le seul organisme à avoir mis en avant les premières études épidémiologiques en Nouvelle-Calédonie. Des premières données sur d'autres espèces que les anguilles sont disponibles et seront détaillées dans cette partie. Cependant, peu d'études ont été réalisées au niveau de l'appareil respiratoire et cardiovasculaire humain et sur les anguilles marbrées, c'est la raison pour laquelle nous nous appuyons sur d'autres types cellulaires et d'autres espèces d'anguilles pour présenter ce qui est connu aujourd'hui sur la toxicité des PUF et NPs de Ni et NiO.

¹ QUAVAR : Qualité des eaux douces et valeurs de rejet pour les cours d'eau des milieux ultramafiques. Porteur de Projet : Dr Gunkel-Grillon Peggy, 2019-2022

2.1. Études épidémiologiques

L'exposition de l'Homme au Ni se fait majoritairement chez les travailleurs des raffineries de Ni et les miniers. Cependant, en raison de la géologie atypique de la Nouvelle-Calédonie et de l'exploitation du Ni dans des mines à ciel ouvert, toutes les populations environnantes peuvent être exposées. Ces mêmes populations sont aussi exposées en ville en vivant proche des usines de Ni, notamment de l'usine de la SLN en plein cœur de Nouméa.

2.1.1. Données dans les raffineries de nickel

Les premières données sur l'imprégnation de Ni chez les travailleurs de raffineries remontent à plusieurs dizaines d'années, dans les années 1980, où l'équipe d'Andersen *et al.* a autopsié les poumons de 39 travailleurs norvégiens de raffineries entre 1978 et 1984, travaillant dans différents secteurs de l'usine et à différents postes. Cette étude est certes réalisée sur un nombre très restreint de travailleurs, mais elle a néanmoins mis en évidence, d'une part, que ces travailleurs présentaient des niveaux élevés de Ni dans les tissus pulmonaires et, d'autre part, que les travailleurs exerçant dans les départements d'électrolyse et de grillage-fusion ont accumulé plus de Ni dans leurs poumons. De plus, les travailleurs chez qui un cancer du poumon a été diagnostiqué présentaient les mêmes concentrations de Ni dans les poumons à l'autopsie que ceux décédés d'autres causes (Andersen and Svenes, 1989). D'autres études ont confirmé ces observations, notamment, sur des coupes histopathologiques de poumons de travailleurs de raffineries (Pays de Galles, Canada, Norvège). Il a été montré une prévalence accrue de cancers du poumon chez les ouvriers de types carcinomes spinocellulaires (Sunderman, 1989, Sunderman et al., 1989). Des cancers du nez, des bronchites chroniques, de l'asthme, des sinusites et des rhinites seraient également prépondérants chez ces travailleurs (Norseth, 1994, Prueitt et al., 2020). Cependant, même si le Ni est classé comme cancérigène du groupe 1 (cancérogène pour l'Homme) et le Ni métallique du groupe 2B (agents possiblement cancérigènes pour l'Homme) par le CIRC, les mécanismes d'action toxique précis sont encore discutés et mal connus. Suite à ces classifications, des réglementations ont été mises en place sur l'exposition professionnelle. En France, la valeur limite moyenne d'exposition professionnelle (VLEP) sur 8 heures du Ni élémentaire et des dérivés inorganiques est de 1 mg/m³. Le Comité Scientifique Européen en charge de proposer des limites d'exposition professionnelle (SCOEL - Scientific Committee on Occupational Exposure Limits) a adopté en Juin 2011 une VLEP de 0,005 mg Ni /m³ pour la fraction

respirable (PM₁₀) et de 0,01 mg Ni/m³ pour la fraction inhalable (PM_{2.5} et PUF). Ces valeurs sont établies pour protéger des effets inflammatoires pulmonaires, mais également des effets cancérigènes (OCRC, Occupational Cancer Research Center 2012). Certains pays, dont la France, reconnaissent d'ailleurs les cancers du poumon comme maladie professionnelle chez les travailleurs de raffineries de Ni.

2.1.2. Données épidémiologiques en Nouvelle-Calédonie

Peu d'études ont donc été menées sur les effets potentiellement générés sur les populations environnantes après inhalation des PUF et des NPs de Ni ou de NiO. Cependant, comme détaillé dans la partie 2, les concentrations atmosphériques de Ni présent dans les PM₁₀ en Nouvelle-Calédonie sont supérieures aux réglementations européennes, ce qui laisse supposer des effets toxiques et des impacts sanitaires. Au regard des chiffres dans les PM₁₀ nous pouvons, également, supposer que les concentrations de Ni dans les PUF sont tout aussi importantes et inquiétantes. La première étude qui a visé à caractériser le potentiel de dispersion et d'inhalation des ETM a été réalisée par le CNRT-Nickel dans le cadre du projet DMML (Dispersion des métaux de la mine au lagon) dans lequel il a été montré que les particules fines émises par les activités minières sont particulièrement chargées en ETM dont le Ni, et sont facilement inhalables, présentant donc un risque pour la santé humaine (Pasquet et al., 2018, Pasquet et al., 2016a). L'étude épidémiologique METEXPO (Niveaux d'imprégnation et déterminants de l'exposition humaine aux métaux) en 2013 est la seule étude ayant démontré que les calédoniens sont imprégnés de Ni. En revanche, dans cette étude, toutes les voies d'expositions sont prises en compte, inhalation et ingestion (eau et aliments contaminés par l'eau d'irrigation ou les retombées atmosphériques des poussières). L'étude réalisée sur 732 néo-calédoniens (adultes et enfants), a montré que le taux urinaire moyen en Ni était de 5,7 µg/g de créatinine, soit une fois et demi supérieure à la valeur de référence recommandée dans la population générale selon l'INRS (> 3,8 µg/g créatinine) (St-Jean et al., 2018). Les concentrations les plus importantes sont retrouvées chez les enfants et les populations vivant sur un sol ultramafique. À titre de comparaison, les taux retrouvés dans les urines sont supérieurs aux taux retrouvés en Métropole, en Allemagne et au Canada. C'est à l'heure actuelle la seule étude confirmant que les calédoniens sont exposés, cependant, aucuns travaux portant sur les fonctions respiratoires et cardiovasculaires n'ont été réalisés. Des chercheurs ont néanmoins essayé de collecter des données mais le registre informatique

permettant de recueillir les données sur les cancers pulmonaires et les voies respiratoires ne recenserait que 80 % des cas. De plus, les dossiers médicaux sont souvent incomplets ce qui inclue trop de biais pour pouvoir établir des données analysables (Blanc and Goldberg, 1985). Cependant, il est rapporté par les pneumologues du Centre Hospitalier Territorial de Nouvelle-Calédonie, une prévalence importante de cancers du poumon chez des sujets jeunes (< 40 ans) (CNRT-Nickel) et une association à but non lucratif a été fondée en 2007 pour la prévention des pathologies respiratoires en Nouvelle-Calédonie notamment pour un soutien logistique, psychologique et financier afin d'optimiser la prise en charge des patients (Assoce, 2007). D'autres études sont en cours sur les prochaines années (2020-2023), notamment, l'étude CAMEVAL (Caractérisation quantitative et qualitative des poussières émises par les activités minières et évaluation des risques sanitaires associés) qui vise à caractériser la composition des PM₁₀ et PM_{2.5} pour apprécier le risque sanitaire, ainsi que l'étude METALICA Santé et Aliments qui a pour but de mieux apprécier les risques liés à l'ingestion des ETM (CNRT-Nickel).

2.2. Études *in vivo*

Certaines études *in vivo* ont été réalisées chez les rongeurs et les poissons afin d'essayer d'élucider les conséquences physiologiques d'une exposition aux particules de Ni ou de NiO. Les expositions chez les rongeurs ont été faites en laboratoire, en revanche les études chez le poisson ont été réalisées *in situ*.

2.2.1. Chez les rongeurs

Quelques études *in vivo* ont été réalisées sur des rongeurs afin d'évaluer la toxicité pulmonaire des NPs de NiO et du Ni par instillation intra trachéale.

Chez le rat Wistar, il a été montré qu'une instillation de ces NPs entraînait l'apparition de protéinoses alvéolaires ainsi qu'une inflammation pulmonaire caractérisée par une augmentation significative de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, de macrophages et de lymphocytes pulmonaires (Senoh et al., 2017, Lee et al., 2016). Des fibroses pulmonaires en lien avec l'activation du facteur de croissance TGF- β 1, cytokine impliquée dans la croissance, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose ont, également, été observées (Chang et al., 2017b). Les mêmes résultats sont retrouvés chez les souris avec des signes d'inflammation pulmonaire (augmentation des neutrophiles, chimiokines et cytokines dont l'IL-6) ainsi que la

génération d'ERO et des lésions génotoxiques (augmentation des taux de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) et une fibrose pulmonaire (Mo et al., 2019, Bai et al., 2018). Une dysfonction endothéliale est également rapportée, probablement due à une inhibition de la dimérisation de la eNOS, et donc à une diminution de la biodisponibilité du NO (Ying et al., 2013). L'ensemble de ces données expérimentales *in vivo* laissent suggérer que l'exposition à des NPs de NiO et de Ni serait à l'origine d'une toxicité pulmonaire. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires ne sont pas réellement détaillés dans ces études.

Une toxicité hépatique est, également, rapportée après instillation de NPs de NiO ou de Ni chez des rats, caractérisée par un stress oxydant avec une surproduction d'ERO et d'ERN, et l'activation des MT. Les examens histologiques montrent une peroxydation lipidique des membranes entraînant une altération de la fonction hépatique (Yu et al., 2018) ainsi qu'une inflammation avec une régulation à la hausse de NF- κ B, des cytokines inflammatoires (dont l'IL-6) et des médiateurs apoptotiques (caspases-3 et 9) (Iqbal et al., 2021). Les métabolismes lipidique et glucidique semblent aussi être altérés (Ali et al., 2021).

Les NPs de Ni semblent aussi toxiques au niveau des reins, de l'appareil reproducteur et du compartiment sanguin chez les rongeurs (Dumala et al., 2018, Liberda et al., 2010, Kong et al., 2014).

2.2.2. Chez les poissons

Depuis plusieurs années, des auteurs s'intéressent à l'impact des exploitations minières, dont celles du Ni, sur des poissons carnivores de fin de chaîne trophique. Plus récemment, des premières études sur cette problématique en Nouvelle-Calédonie ont émergé mais rien n'a encore été réalisé sur les *A. marmorata*. Il existe relativement peu d'études sur la toxicité du Ni chez les poissons par rapport à d'autres métaux comme le Cu ou le Cd. Pourtant, selon Buhl *et al.*, le Ni serait le 4^{ème} métal le plus toxique d'après une étude réalisée sur trois espèces de poissons qui sont la truite arc-en-ciel, l'ombre Arctique et le saumon argenté, en comparaison à sept autres métaux (Cd > Ag > Hg > Ni > Au > As > sélénium > Cr) (Buhl and Hamilton, 1991).

Au Canada, 6^{ème} producteur mondial de Ni, des études réalisées sur la perche jaune, *Perca flavescens*, ont montré que les poissons se contaminaient majoritairement par la voie du Ni dissous dans l'eau en comparaison à la contamination via leur régime alimentaire, et que les deux organes les plus bioaccumulateurs étaient le foie et les reins. Il a été supposé que les poissons,

dans les régions les plus contaminées aux ETM, s'acclimataient à long terme et toléraient l'exposition aux ETM dont le Ni. Cependant, aucune étude transcriptomique ou biochimique n'a été réalisée (Couture et al., 2008). Des résultats similaires ont été retrouvés chez la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*, exposée au Ni, Cd et Cr pendant 6 mois où les métaux se bioaccumulaient surtout au niveau du foie, des reins et des branchies. Les auteurs ont montré une altération du métabolisme glucidique irréversible avec une surconsommation des glucides au niveau hépatique et une chute des réserves énergétiques probablement en lien avec une dysfonction hépatique et pancréatique. Une altération du contenu en acide sialique au niveau branchial, responsable d'altérations durables des mucines épithéliales est aussi rapportée. Dans cette étude, il a été mis en évidence un lien entre le sexe, le cycle saisonnier et la réponse biochimique. En effet, les mâles semblent plus sensibles à l'exposition aux métaux en hiver par rapport aux femelles (Arillo et al., 1982). Quant aux études sur les anguilles, tels que l'anguille épineuse, *Mastecembelus armatus*, ou l'anguille des marais, *Monopterus albus*, exposée au Ni dans des cours d'eau pollués ou proches d'usine ou de mine de Ni, les organes les plus bioaccumulateurs restent les branchies, le foie et les reins, et très peu les muscles. Le foie étant l'organe le plus altéré, tout comme chez les truites, il est observé une chute du glycogène hépatique, des altérations histopathologiques et une augmentation des MT (Javed and Usmani, 2013, Yin et al., 2012, Sow et al., 2013, Sow et al., 2019). En ce qui concerne la bioaccumulation au niveau rénal, le Ni pourrait se comporter comme un analogue du Mg^{2+} dans les reins ce qui entraîne une absorption et une réabsorption rénale très efficace du Ni via les transporteurs de Mg^{2+} (Pane et al., 2005, Pane et al., 2006a), ce qui explique pourquoi le Ni s'accumule facilement et majoritairement dans cet organe. Des auteurs suggèrent d'ailleurs qu'il existe un mécanisme dans les reins permettant une élimination et une régulation des taux de Ni, jusqu'à une certaine concentration (Pane et al., 2006a, Pane et al., 2006b).

Il est, également, intéressant de noter que le stade de vie des poissons semble être important. Dans la plupart des cas, les stades précoces larvaires sont plus sensibles aux effets toxiques du Ni que les poissons adultes, même si cela peut varier en fonction des espèces (Birge and Black, 1980, Nebeker et al., 1985).

En ce qui concerne les études en Nouvelle-Calédonie, des travaux sur les poissons coralliens du lagon (murènes et congres) ont bien mis en évidence des concentrations alarmantes en ETM surtout en Ni et Cr chez ces poissons (Bonnet et al., 2014). Des études, démarrées en 2008, sont

en cours afin d'étudier l'impact de l'industrialisation minière sur la population de plusieurs dizaines d'espèces aquatiques (Chabanet et al., 2010). Le CNRT-Nickel au cours du projet DMML en 2016 a fait des premières études sur 5 espèces de poissons (la carpe, *Khulia rupestris*, les gobies, *Awaous guamensis* et *Sicyopterus lagocephalus*, le tilapia *Sarotherodon occidentalis* et les anguilles marbrées, *A. marmorata*) vivant dans des rivières sous influence minière, et ont montré des concentrations en ETM importantes au niveau branchial et hépatique (CNRT-Nickel).

De plus, plusieurs études tendent à montrer que le Ni serait beaucoup plus toxique pour les poissons des cours d'eau douce que ceux vivant dans des eaux dures, notamment, car les fortes concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} dans les eaux dures protégeraient les poissons de la toxicité du Ni par compétition pour les sites d'entrée des métaux au niveau branchial (Playle et al., 1992, Erickson et al., 1996). Tout comme un pH élevé qui modifierait la spéciation du Ni et protégerait également les poissons de cette toxicité, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer ce phénomène (Pyle and Couture, 2012).

Les principales études réalisées sur l'impact d'une exposition au Ni chez les poissons carnivores mettent surtout en avant les principaux organes qui concentrent le plus de métaux. Quelques études sont, également, faites sur le métabolisme lipidique mais aucune étude transcriptomique n'a été réalisée à ce jour.

2.3. Études *in vitro*

Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées afin de regarder le mécanisme cellulaire et moléculaire de la toxicité des PUF ou NPs de NiO et de Ni mais nous ne présenterons que des études réalisées sur des modèles cellulaires proches des nôtres, à savoir les cellules vasculaires pulmonaires et les hépatocytes.

2.3.1. Cellules Humaines : A-549 et BEAS-2B

Concernant les mécanismes de toxicité des PUF et des NPs de NiO et de Ni, quelques études *in vitro* ont été menées sur des cellules de l'appareil respiratoire humain, en particulier, sur des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) et alvéolaires (A549). Ces études ont mis en évidence une cytotoxicité, entraînant ainsi une diminution de la viabilité cellulaire dès de faibles concentrations sur les deux types cellulaires (Mohamed et al., 2018, Latvala et al., 2016, Capasso et al., 2014, Duan et al., 2015).

Il a, également, été montré que les NPs de Ni génèrent un stress oxydant relativement important, avec, d'une part, une augmentation de la production d'ERO cellulaires, et, d'autre part, une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD, la CAT ou encore la GPX (Horie et al., 2011, Duan et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les cellules n'ont pas les capacités de défense enzymatique nécessaires permettant de contrer l'augmentation de la production d'ERO. Les ERO produites sont ensuite à l'origine du déclenchement des voies de l'inflammation. En effet, des auteurs ont montré une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-6 et les IL-8 dans les deux types cellulaires (Capasso et al., 2014). Le stress oxydant généré, comme expliqué dans le paragraphe 1.2., peut altérer la mitochondrie, ce qui a été montré dans des A549 exposées aux NPs de NiO avec une peroxydation lipidique au niveau de la membrane mitochondriale (Ahamed, 2011). Ces dysfonctionnements mitochondriaux, dans les A549 et les BEAS-2B, seraient à l'origine de l'activation des voies de l'apoptose avec une augmentation des caspases et de la transcription de *bax* (Ahamed, 2011, Duan et al., 2015, Di Bucchianico et al., 2018).

Enfin, un autre aspect de la toxicité des particules de Ni et de NiO, mis en évidence dans ces études, est une altération de l'homéostasie calcique avec une augmentation des concentrations de calcium dans le cytoplasme. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces altérations ne sont pas décrits (Di Bucchianico et al., 2018), même si une étude démontre que cette augmentation provient d'une fuite du calcium des organites cellulaires après une exposition de cellules épithéliales au NiCl₂ (Cortijo et al., 2010). Le Ni pourrait se lier à la calmoduline et ainsi l'activer, ce qui pourrait également expliquer la perturbation calcique observée dans les cellules respiratoires (Kasprzak, 1987).

Il est cependant important de souligner qu'aucune étude n'a été réalisée sur des cellules endothéliales humaines, pourtant cibles des particules inhalées telles que les PUF et les NPs.

2.3.2. Hépatocytes

En ce qui concerne la toxicité de ces particules au niveau hépatique, aucune étude n'a été faite sur des hépatocytes d'anguilles mais il existe des travaux sur des hépatocytes de rongeurs, de truites arc-en-ciel ou de poissons rouges.

De la même manière que dans les cellules respiratoires humaines, une cytotoxicité et un stress oxydant sont rapportés dans des hépatocytes de rats et humains (HepG2). Dans les hépatocytes

de poisson plat, le Cardeau hirame, *Paralichthys olivaceus*, il est observé une diminution de l'activité de la SOD (Sun et al., 2020). Ces études, après analyses biochimiques et transcriptomiques montrent, également, que le NiO et le Ni activeraient les voies de l'apoptose avec une augmentation de l'expression de *p53* et *bax* et une diminution de *bcl-2*, ainsi qu'une augmentation des niveaux des caspases 12, 9 et 3 (Chang et al., 2017a, Saquib et al., 2018), probablement en lien avec une dysfonction mitochondriale. En effet, après exposition à des particules de Ni sur des hépatocytes de poissons rouges, il est observé une inhibition du métabolisme mitochondrial avec une altération de l'activité des enzymes mitochondriales telles que la citrate synthase et la cytochrome C oxydase, et cela, dès de très faibles concentrations en Ni (Garceau et al., 2010). Les hépatocytes exposés au Ni sont gonflés, fibrotiques et nécrosés à de fortes concentrations (Sun et al., 2020). Cette nécrose est, également, observable sur des hépatocytes de carpe argentée, *Hypophthalmichthys molitrix*, exposées au sels de nickel, NiCl₂ (Athikesavan et al., 2006). En ce qui concerne le métabolisme lipidique, une augmentation de la consommation des lipides est montrée, essentiellement sur les modèles de poissons, en lien direct avec les altérations mitochondriales (Garceau et al., 2010, Sun et al., 2020).

Sur l'ensemble des études *in vitro* réalisées sur le Ni, il est observé des mécanismes d'action toxique communs à savoir un stress oxydant, une inflammation, une altération de l'homéostasie calcique ainsi qu'une dysfonction mitochondriale déclenchant la voie de l'apoptose. Cependant, après cette revue de la littérature, ces données sont insuffisantes, voire inexistantes, en ce qui concerne notre étude et nos modèles biologiques. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de toxicité des NPs de NiO sur des CE humaines n'est pas connue. De plus, en ce qui concerne le volet d'écotoxicologie, aucune étude ne vise à élucider, d'une part, les mécanismes d'action toxique de ces NPs dans des hépatocytes d'anguille et, d'autre part, les conséquences d'une exposition chronique aux ETM sur les anguilles marbrées *in vivo*.

OBJECTIFS

Dans ce travail de Thèse se pose alors une question : Quels sont les impacts sanitaires et environnementaux de l'exploitation minière en Nouvelle-Calédonie ? Afin de répondre à cette vaste question notre travail s'est divisé en deux parties autour de deux objectifs différents.

Objectif 1 : Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires de la toxicité des NPs de NiO et de latérites nickélifères sur des cellules en culture *in vitro* ?

Pour répondre à cet objectif nous avons travaillé sur deux types cellulaires : des cellules vasculaires humaines et des hépatocytes de poissons. Sur chacun des types cellulaires, nous avons évalué de nombreux paramètres caractéristiques de la toxicité des NPs de NiO, à savoir, le stress oxydant, l'inflammation, la signalisation calcique, les altérations mitochondriales et la cytotoxicité notamment via l'apoptose. L'objectif était ainsi d'évaluer s'il existe un mécanisme d'action toxique commun des NPs de NiO sur les deux types cellulaires et de comparer la toxicité des particules fines de latérites nickélifères potentiellement inhalées par l'Homme, ou des sels de nickel retrouvés dans les eaux, à celles des NPs de NiO manufacturées.

1. Cellules vasculaires humaines HPAEC exposées aux NPs de NiO

Les cellules vasculaires humaines choisies sont des cellules d'artères pulmonaires humaines, HPAEC. En effet, comme décrit dans l'introduction, les HPAEC sont des cibles privilégiées des effets nocifs des particules inhalées. Les NPs de NiO pourraient franchir la barrière alvéolo-capillaire au niveau des alvéoles pulmonaires, se retrouver dans la circulation sanguine, et ainsi, avoir des effets néfastes sur les cellules endothéliales tapissant la lumière des artères pulmonaires. Ainsi, toute dysfonction endothéliale pourrait à long terme contribuer au déclenchement de pathologies cardiovasculaires telle que l'HTA. Cette étude fait l'objet d'un article "NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption" publié en janvier 2022 dans le journal *Nanotoxicology* (IF : 5.91).

2. Hépatocytes d'anguilles HEPA-E1 exposées aux NPs de NiO et aux sels de NiCl₂

Chez les anguilles, le foie est un organe particulièrement important en étant le principal organe de détoxification des métaux et de la métabolisation des lipides, essentiel pour la migration et la reproduction des anguilles comme décrit en introduction. C'est pourquoi notre étude a été

réalisée sur des hépatocytes d'anguille afin d'apprécier comment la fonction hépatique pourrait être altérée, et pour explorer si des voies communes d'intoxication sont observées avec les HPAEC. À noter que nous avons travaillé sur des hépatocytes d'anguilles du Japon pour répondre à notre problématique car il s'agit de la seule lignée cellulaire d'hépatocytes d'anguilles existante à ce jour. Cette étude fait l'objet d'un article "Cellular and molecular mechanisms of NiONPs toxicity on eel hepatocytes HEPA-E1: an illustration of the impact of Ni release from mining activity in New Caledonia" publié en septembre 2022 dans le journal Chemosphere (IF : 7.04). En résultats complémentaires de cette étude, nous avons voulu évaluer la toxicité de sels de nickel NiCl_2 dissous, car ils sont potentiellement retrouvés dans le milieu au cours de l'exposition des cellules *in vitro*, mais aussi car ils sont présents dans les rivières *in situ*. Ainsi, il s'agissait d'évaluer ici si le risque majeur de toxicité vient plutôt de la fraction dissoute de Ni présente en milieu naturel ou bien plutôt de l'activité humaine (NPs de NiO). Pour répondre à cette interrogation, nous avons évalué la cytotoxicité, le stress oxydant et l'inflammation sur les HEPA-E1 après exposition avec du NiCl_2 .

3. Cellules vasculaires humaines HPAEC exposées aux latérites nickélifères

Après avoir décrit le mécanisme de toxicité des NPs de NiO sur les HPAEC et les HEPA-E1, nous avons voulu voir, sur des cellules vasculaires pulmonaires humaines, si des particules fines directement prélevées en Nouvelle-Calédonie étaient plus ou moins toxiques comparé aux NPs de NiO. En effet les NPs de NiO sont majoritairement émises à cause de l'activité minière (procédé hydro métallurgique utilisé, usines) alors que les particules de latérites sont naturellement mises en suspension et disséminées dans l'atmosphère depuis les sols à cause de la forte érosion de ces sols latéritiques et de l'activité humaine. Il est alors intéressant d'évaluer si le risque majeur de l'exposition aux particules de nickel et métaux associés vient de la pollution atmosphérique naturelle ou bien anthropique en Nouvelle-Calédonie. Pour cela deux types de latérites ont été analysées puis comparées aux NPs de NiO en regardant leur cytotoxicité, leur capacité à générer des ERO, l'effet pro-inflammatoire ainsi que la perturbation de l'homéostasie calcique. Cette étude fait l'objet d'un article prêt à être soumis dans Toxicology (IF : 4.6).

Objectif 2 : Quels sont les impacts au niveau fonctionnel d'une exposition aux métaux, dont les NPs d'oxydes de nickel ?

Ce second objectif a pour but d'évaluer si une exposition aux métaux et aux NPs de NiO pourrait avoir des conséquences fonctionnelles, d'une part sur une population souffrant déjà d'une pathologie cardiovasculaire préexistante et, d'autre part, sur les anguilles vivant en milieu naturel à proximité des mines. Pour répondre à cet objectif, des cellules HPAEC ont été cultivées *in vitro* dans un modèle mimant une pathologie cardio-vasculaire, et des études morphométriques et transcriptomiques ont été réalisées sur des anguilles marbrées, après prélèvements des individus *in situ*.

1. Modèle pathologique *in vitro* mimant une dysfonction endothéliale

La question ici est de s'interroger si, *in vitro*, les effets toxiques des NPs de NiO observés sur les HPAEC peuvent être amplifiés sur des cellules cultivées en condition pathologique. En effet, un modèle *in vitro* développé au CRCTB nous permet de mimer la dynamique et l'environnement vasculaire des cellules HPAEC lors d'une dysfonction endothéliale retrouvée dans des pathologies cardio-vasculaires telles que l'HTP. Cela nous permet ainsi d'apprécier le risque pour une population ayant une pathologie cardio-vasculaire préexistante de faire des exacerbations de leur pathologie en comparaison avec une population saine, en cas d'exposition à ces particules. Cette étude fait l'objet d'un article "NiONPs-induced oxidative stress and mitochondrial impairment in an *in vitro* pulmonary vascular cells model mimicking endothelial dysfunction" publié en avril 2022 dans le journal Antioxydant (IF : 7.67).

2. *Anguilla marmorata* : cible de la contamination des rivières aux métaux

Enfin, nous nous sommes intéressés aux potentiels impacts générés par les activités minières en Nouvelle-Calédonie sur les anguilles prélevées en milieu naturel, tenant compte de toute la complexité des facteurs pouvant influencer sur l'état de santé de ces poissons, en plus du Ni lui-même. Pour cela, les anguilles ont été pêchées soit dans des cours d'eau sous influence minière soit dans des cours d'eau loin des mines. L'objectif principal était d'évaluer, par des études morphométriques et transcriptomiques, si les concentrations importantes en métaux dans les rivières ont un impact fonctionnel sur ces poissons, et ainsi, de comprendre quels pourraient être les risques d'une telle exposition pour la population d'*Anguilla marmorata*. La mission menée en

Nouvelle-Calédonie a été réalisée dans le cadre du projet QUAVAR financé par le CNRT-Nickel défini en introduction, en partenariat avec le laboratoire ISEA de l'Université de la Nouvelle-Calédonie et le bureau d'étude Bioeko, tous deux basés à Nouméa. Cette étude fait l'objet d'une publication "Impact of nickel mining in New Caledonia on marbled eels *Anguilla marmorata*" publiée en août 2022 dans Journal Of Hazardous Material (IF : 14.29).

Les objectifs sont résumés en figure 37.

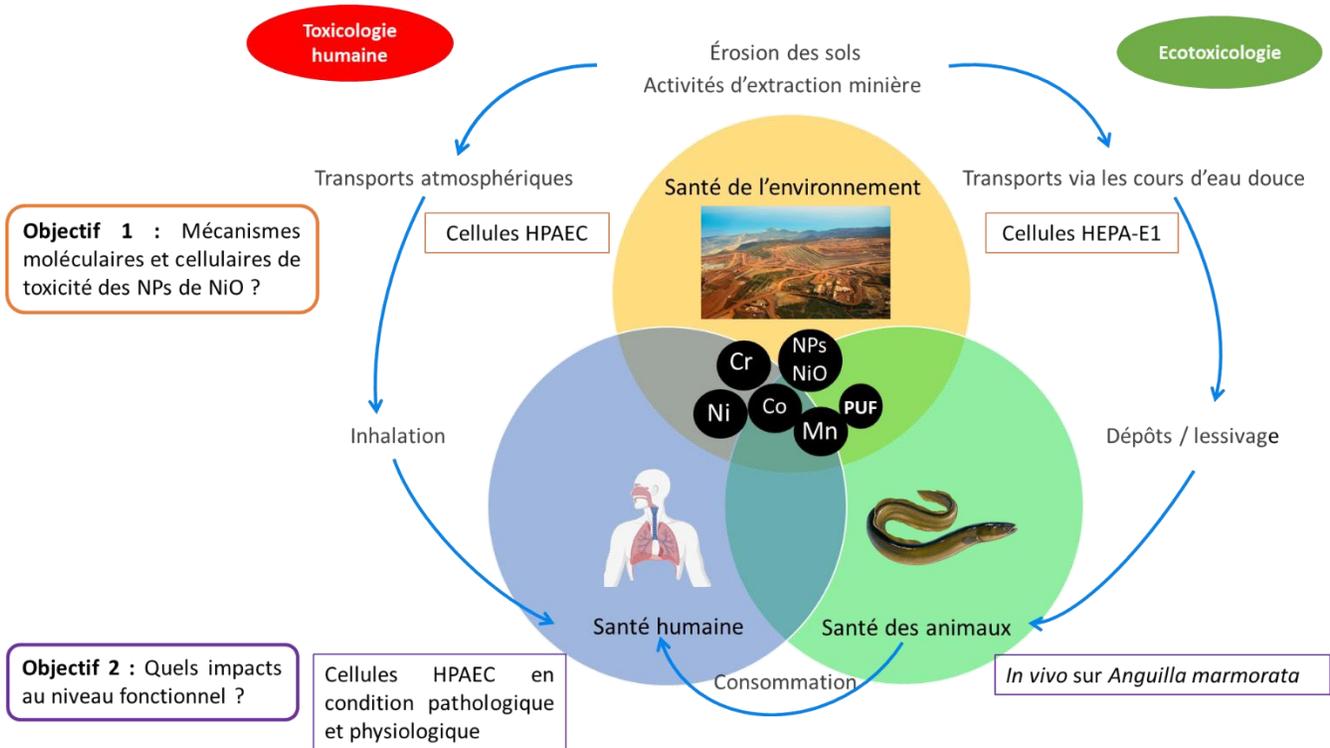


Figure 37 : Résumé des objectifs

MATERIELS ET METHODES

Partie 1 : Matériels

1. Milieux de culture et réactifs

Le milieu rouge complet (MRC) contient de l'ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) complétementé avec du SupplementMix (PromoCell®) contenant 2 % de sérum de veau fœtal (SVF), 0.4 % d'Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS), 0.1 ng/ml d'Epidermal Growth Factor (EGF), 1 ng/ml de Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF), 90 µg/ml d'héparine et 1 µg/ml d'hydrocortisone. Ce milieu de culture est utilisé pour l'entretien, l'ensemencement et l'amplification des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC).

Le milieu blanc complet (MBC) contient de l'ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) sans rouge de phénol complétementé avec du SupplementMix (PromoCell®) selon les recommandations du fournisseur. Ce milieu de culture est utilisé pour l'intoxication et les différentes expérimentations sur les HPAEC.

Le milieu ERDF (ERDF-M) contient de l'ERDF (Kyokuto Pharmaceuticals®, Japon) complétementé avec 1 % d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine, 1 000 UI / 100 000 UI, Sigma-Aldriech®, États-Unis), du bicarbonate de sodium NaHCO₃ (1130 mg/L), du Supplement RD-1 ERDF (Kyokuto Pharmaceuticals®, Japon) et 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio®, France) reconstitué selon les recommandations du fournisseur. Ce milieu de culture est utilisé pour l'entretien, l'ensemencement et l'amplification des hépatocytes d'anguille du Japon (HEPA-E1).

Le milieu Leibovitz L-15 (L15M) (Fischer Scientific®, France) sans rouge de phénol est complétementé par 1 % d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine, 1 000 UI / 100 000 UI, Sigma-Aldriech®, États-Unis), 5 % de SVF (Eurobio®, France) et 3 % de Supplement GlutaMAX (Fischer Scientific®, France). Ce milieu de culture est utilisé pour l'intoxication et les différentes expérimentations sur les HEPA-E1.

Les antioxydants, tels que la polyéthylène glycol-superoxyde dismutase (PEG-SOD) et la polyéthylène glycol-catalase (PEG-CAT), sont utilisés pour détoxiquer les ERO formés dans le cytoplasme. La SOD et la CAT sont couplées à du PEG afin d'avoir la propriété de pénétrer dans le

cytoplasme de la cellule. Les cellules sont prétraitées, pendant 1 h, avec la PEG-SOD (300 U/ml) et la PEG-CAT (600 U/ml) avant d'être exposées aux particules pendant 4 h ou 24 h.

Un chélateur de calcium extracellulaire, l'EGTA (acide egtazique), est utilisé afin d'observer l'impact du calcium extracellulaire sur le calcium intracellulaire. Les cellules sont prétraitées, pendant 1 h, avec l'EGTA (5 mM) avant d'être exposées aux particules pendant 4 h.

Les solutions physiologiques utilisées :

Tableau 2 : Composition du Mac/Krebs, pH ajusté à 7.4 avec du NaOH puis filtré (0.2 µm)

Mac / Krebs	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	130
Chlorure de potassium (KCl)	5.6
HEPES	8
D-Glucose	11
Magnésium	1
Calcium	2

Tableau 3 : Composition du Krebs-HEPES bicarbonate (KHB), pH ajusté à 7.4 à l'aide de NaOH et filtré (0.2 µm)

Krebs-HEPES Buffer	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	118.4
Chlorure de potassium (KCl)	4.7
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	1.2
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	4
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	1.2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2
HEPES	10
D-Glucose	6

Les sondes utilisées en microscopie confocale pour la détection des organelles de la cellule :

Tableau 4 : Détection des organites de la cellule par sonde fluorescente

Organites	Sondes fluorescentes	Concentrations (longueurs d'onde en em/ex)
Mitochondries	Mitotracker	1 μ M (488/515 nm)
Noyau	Hoeschst 33342	2 μ M (408/450 nm)

2. Les différentes particules et sels de nickel utilisés

2.1. Les nanoparticules d'oxyde de nickel (NPs de NiO)

Les NPs de NiO sont commercialisées par Sigma-Aldrich® et possèdent les caractéristiques suivantes : pureté 99.8 %, répartition granulométrique < 50 nm (Microscopie Électronique à Transmission, MET), densité 6.67 g/mL à 25 °C. La caractérisation des NPs de NiO (9.5 μ g/mL) dans les milieux de culture MBC et L15M a été réalisée à l'Institut de la chimie de la matière condensée de Bordeaux (ICMCB) par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un granulomètre Vasco (Cordouan®). Pour obtenir une suspension particulaire à 2 mg/mL, les NPs sont pesées directement dans des tubes en verre étant donné qu'elles sont fortement électrostatiques, puis elles sont mises en suspension dans du MBC ou du L15M. La suspension particulaire est conservée à 4°C. Afin d'éviter l'agrégation des NPs, la solution mère est soniquée avec une sonde à induction, trois fois, pendant 30 sec, à 130 W, 56-60 Hz, à l'aide d'un sonicateur (VibraCell® 75186). Entre chaque cycle de sonication, la solution mère est vortexée 30 sec.

2.2. Les sels de nickel, NiCl₂

Une solution mère de NiCl₂ est préparée à 2 mg/mL grâce à l'utilisation d'une ampoule Titrisol (Merck) contenant 1 g de NiCl₂, diluée dans 500 mL d'eau ultrapure et acidifiée à 1 % à l'aide d'HNO₃. Cette solution est ensuite utilisée diluée dans du L15M aux concentrations attendues pour chaque expérimentation (0.5 – 80 μ g/mL).

2.3. Les particules de latérites

Les latérites K4 et RT1 ont été prélevées en 2013, respectivement dans l'enceinte du site minier Koniambo-Nickel SAS (KNS-SAS) au Mont Koniambo et au bord de la rivière Taléa aval près du décanteur de KNS-SAS, dans le Nord de la Nouvelle-Calédonie. Les échantillons présentent une teneur en Ni d'environ respectivement 7 % et 5 % (tableau 1). Les latérites sont broyées sur place pour obtenir des particules de taille de l'ordre de 10 μm (PM_{10}), puis une seconde étape de broyage a été réalisée à l'Université de Bordeaux. Cette dernière étape de broyage a permis d'obtenir des particules de taille de l'ordre de celle de $\text{PM}_{2.5}$. Elle est réalisée au Laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux (LTPIB) à l'aide d'un broyeur à galet (Fritsch pulverisette 7[®]) avec 5 cycles de 60 secondes à 8 rpm. La caractérisation des latérites est ensuite réalisée à l'ICMCB par la technique de DLS à l'aide d'un granulomètre VASCO (Cordouan[®]). Pour obtenir une suspension particulaire à 2 mg/mL, les latérites sont pesées directement dans des tubes en verre, puis sont mises en suspension dans du MBC. La suspension particulaire est conservée à 4°C. Afin d'éviter l'agrégation des latérites, la solution mère est soniquée avec une sonde à induction, trois fois, pendant 30 sec, à 130 W, 56-60 Hz, à l'aide d'un sonicateur (VibraCell[®] 75186). Entre chaque cycle de sonication, la solution mère est vortexée 30 sec. Seules les HPAEC ont été exposées avec les latérites.

3. La culture cellulaire

3.1. Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, HPAEC

Nos études ont porté sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines étant donné, d'une part, le rôle important de ces cellules dans la physiologie vasculaire, et, d'autre part, qu'elles constituent une cible privilégiée des particules inhalées. Les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAEC), commercialisées par PromoCell[®], sont isolées à partir de l'artère pulmonaire principale de plusieurs patients Caucasiens âgés de 34, 56 et 68 ans ayant subi une exérèse pulmonaire (figure 38), respectivement lots 433Z034.1 ; 458Z016.12 et 451Z031.14. Les cellules sont cultivées dans du MRC, en monocouche, dans des flasques de culture de 25 cm^2 (Falcon[®]), à une densité de 20 000 cellules/ cm^2 . Elles sont incubées à 37 °C, en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO_2 à pH = 7.4. Le milieu est changé tous les deux jours. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont repiquées selon les recommandations du fournisseur, à l'aide du DetachKit

(PromoCell[®]) contenant de l'HEPES-BSS, de la Trypsine/EDTA et un inhibiteur de trypsine (TNS). Les cellules sont ensuite centrifugées, 5 min à 4 °C et 3 000 g et le culot cellulaire est remis en suspension dans 2 mL de MRC. La concentration cellulaire est déterminée par comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer en présence d'un colorant d'exclusion, le bleu de Trypan. En fonction de l'expérimentation les cellules sontensemencées dans des plaques 12, 24 ou 96 puits, à une densité de 20 000 à 50 000 cellules/cm². Les cellules sont utilisées entre les passages 2 et 8. Toutes les expérimentations avec les cellules sont effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire dans un laboratoire de type 2.

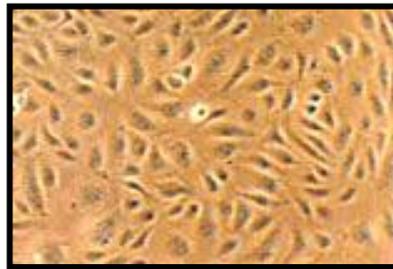


Figure 38 : Cellules HPAEC en culture observées au microscope à contraste de phase (x 600)

Les cellules HPAEC sont également cultivées dans des chambres étirables en silicone grâce au système d'étirement STREX[®] ST-140-10 commercialisé par B-bridge International (figure 39). Ce système permet ainsi d'étirer les HPAEC en les soumettant à des étirements unis axiaux avec une fréquence de 1 Hz. Les cellules sont ensuite placées en environnement hypoxique dans un incubateur à 1 % d'O₂. Ces conditions de culture *in vitro* permettent de reproduire les contraintes physiques que peuvent subir *in vivo* les cellules présentes dans la paroi vasculaire, en mimant la dynamique et l'environnement vasculaires observés lors de l'HTP. Les HPAEC cultivées selon ces conditions expérimentales (condition pathologique : étirement + hypoxie) sont ou non intoxiquées avec des NPs de NiO. Des cellules sont également cultivées en conditions physiologiques (non étirées et en normoxie, 21 % d'O₂) dans des chambres en silicone en parallèle des cellules cultivées en conditions pathologiques.

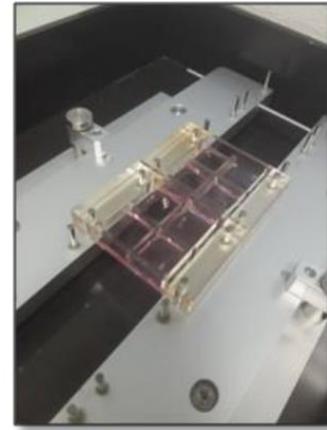


Figure 39 : Appareil STRETX® permettant de mimer *in vitro* la dynamique vasculaire des HPAEC lors de l'HTP

3.2. Hépatocytes d'Anguilles du Japon, *Anguilla japonica*, Hepa-E1

Etant donné le rôle essentiel du foie chez les anguilles, nos études ont porté sur des hépatocytes d'anguilles du Japon, *Anguilla japonica*, seule lignée d'hépatocytes d'anguilles existante à ce jour (Hepatocytes of eel-1, HEPA-E1,). Les cellules HEPA-E1, commercialisées par Riken BRC Cell Bank® (Japon), sont isolées à partir du foie d'anguilles (figure 40). Les cellules sont cultivées dans du ERDF-M, en monocouche, dans des flasques de culture de 75 cm² (Falcon®), à une densité de 20 000 cellules/cm². Elles sont incubées à 28 °C, en atmosphère humide contrôlée sans CO₂ à pH = 7.4. Le milieu est changé tous les trois jours. Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, elles sont repiquées selon les recommandations du fournisseur. Le tapis cellulaire est, dans un premier temps, rincé, à l'aide de PBS, puis les cellules sont dissociées à l'aide de Trypsine/EDTA. L'action de la trypsine est ensuite inhibée avec du ERDF-M. Les cellules sont ensuite centrifugées, 5 min à 4 °C et 3 000 g et le culot cellulaire est remis en suspension dans 2 mL de ERDF-M. La concentration cellulaire est déterminée par comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer en présence de bleu de Trypan. En fonction des expérimentations, les cellules sontensemencées dans des plaques 12, 24 ou 96 puits, à une densité de 20 000 à 50 000 cellules/cm². Toutes les expérimentations avec les cellules sont effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire dans un laboratoire de type 1.

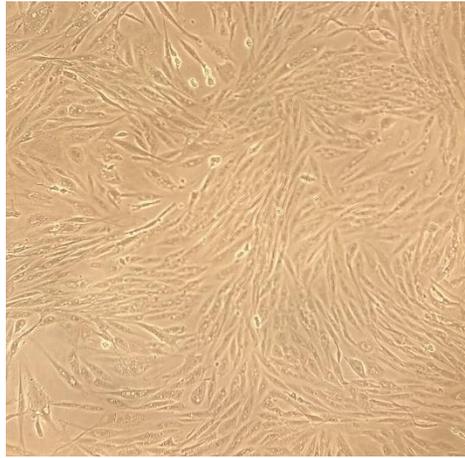


Figure 40 : Cellules HEPA-E1 en culture observées au microscope à contraste de phase 1 (X 600)

4. Démarches expérimentales pour les expérimentations *in vitro*

Différentes expérimentations ont été réalisées sur les cellules *in vitro*, afin de déterminer le mécanisme d'action toxique des NPs de NiO, des sels de nickel NiCl₂ et des latérites (tableau 5). Afin d'éviter l'agrégation des NPs, les suspensions particulaires sont soniquées, dans un bain à ultra-son (3 min à 230 V et 50 Hz, modèle usc100t) et vortexées 3 fois avant d'être diluées, aux concentrations nécessaires, dans du MBC ou du L15M en fonction du type cellulaire. Les cellules sont, dans un premier temps,ensemencées à une densité appropriée dans des plaques 12, 24 ou 96 puits, pendant 24 à 48 h, puis intoxiquées, pendant 4 ou 24 h, avec différentes concentrations de NPs de NiO, NiCl₂ ou latérites. Ces temps sont choisis après la réalisation d'études cinétiques. En effet, la viabilité cellulaire est observée après 24 h d'exposition mais les expérimentations sur le stress oxydant, la signalisation calcique et la fonction mitochondriale sont observées après 4 h d'exposition étant donné que c'est à ce temps-là qu'est observée la plus forte production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'inflammation n'est déclenchée de manière significative qu'après 24 h d'intoxication, de même que les activités de la SOD et les expressions des gènes. Ces différentes expérimentations sont répertoriées dans le tableau 5 et seront détaillées dans la partie 2 Méthodes.

Tableau 5 : Expérimentation réalisées sur les cellules HPAEC et HEPA-E1

Expérimentations	Objectifs	Cellules utilisées	Temps d'exposition
MET	Internalisation	HPAEC HEPA-E1	4 h
WST-1	Viabilité cellulaire et détermination des concentrations à utiliser (< 30 % de mortalité)	HPAEC HEPA-E1	24 h
Sonde CMH ₂ -DCF-DA	Stress oxydant, dosage des ERO globales	HPAEC HEPA-E1	4 h
Résonnance paramagnétique électronique, RPE	Stress oxydant, dosage de l'anion superoxyde cytoplasmique	HPAEC HEPA-E1	4 h
Sonde MitoSOX	Stress oxydant, dosage de l'anion superoxyde mitochondrial	HPAEC HEPA-E1	4 h
Activité de la SOD	Stress oxydant	HPAEC HEPA-E1	24 h
Annexin V / PI	Apoptose	HPAEC	24 h
Production de caspase 9	Apoptose	HEPA-E1	24 h
ELISA IL-6	Inflammation, dosage des IL-6 sécrétées	HPAEC HEPA-E1	24 h
Sondes Fluo4-AM, Rhod-2 et Fluo-4FF	Calcium cytoplasmique, mitochondriale et réticulaire	HPAEC HEPA-E1	4 h et 24 h
Sondes MitoTracker et TMRM	Dysfonction mitochondriale, masse et potentiel de membrane mitochondrial	HPAEC HEPA-E1	4 h et 24 h
Dosages nitrites et nitrates	Stress oxydant, espèces réactives de l'azote	HPAEC	24 h
Sonde DAFFM	Biodisponibilité du NO	HPAEC	4 h et 24 h
ELISA ET-1	Marqueur d'HTP, dosage de l'ET-1 sécrété	HPAEC	24 h
RT-qPCR	Expressions des gènes impliqués dans diverses fonctions	HPAEC HEPA-E1	24 h

5. Anguilles du Pacifique, *Anguilla marmorata*

Dans le but d'étudier *in situ* l'impact de la contamination aux métaux liée à l'activité minière sur la morphologie et l'expression génique des anguilles du Pacifique *Anguilla marmorata*, des échantillonnages ont été réalisés en Nouvelle-Calédonie par pêche électrique grâce au bureau d'études Bioeko qui possède tous les agréments locaux pour assurer ces prélèvements. Plusieurs sites d'échantillonnage sont choisis près du mont Koniambo à Koné, le long d'une rivière sur substrat ultramafique et sous influence minière (mine de KNS, rivière Taléa), et au niveau d'une rivière considérée comme référence, loin des mines et sur sol volcano-sédimentaire (rivière Tivoli) (figure 41). Les poissons ont été pêchés en juillet 2021 sur quatre sites différents : Taléa gauche, directement sous influence de la mine, Taléa droite non directement impactée par la mine, Taléa aval après la confluence de Taléa gauche et droite, et dans la rivière Tivoli (figure 42).



Figure 41 : Sites de prélèvements des poissons : Taléa gauche : 164°46'17.7938" E, 20°59'20.1088" S. Taléa droite : 164°44'58.0870" E, 20°59'7.6787" S. Taléa aval : 164°44'3.1816" E, 20°59'54.6432" S. Tivoli : 164°52'8.5285" E,



Figure 42 : Pêche des poissons par pêche électrique sur les cours d'eau, ici sur la Taléa aval, Nouvelle-Calédonie, juillet 2021

Quatre à six anguilles par site ont été pêchées (tableau 6). A l'issue de la pêche, les poissons sont mesurés, pesés puis disséqués sur place. Après avoir noté les différents paramètres morphométriques de l'anguille (longueur totale, poids total, poids du foie, poids de la rate), les anguilles sont euthanasiées par section de la moelle épinière sans anesthésiant chimique afin d'éviter des biais méthodologiques dans l'étude de l'expression des gènes (Renault et al., 2011).

Tableau 6 : Nombre d'individus par site de prélèvement

Espèce	Taléa gauche	Taléa droite	Taléa aval	Tivoli
<i>Anguilla marmorata</i>	4	5	6	5

Partie 2 : Méthodes

1. Caractérisation des NPs de NiO

1.1. Distribution hydrodynamique de la taille

La distribution hydrodynamique de la taille des NPs de NiO dispersées, à une concentration de 9,5 µg/ ml soit 5 µg / cm²) dans le milieu de culture des cellules endothéliales et des hépatocytes (MBC et L15M respectivement) a été réalisée à l'Institut de la chimie de la matière condensée de Bordeaux (ICMCB), par diffusion dynamique de la lumière (DLS), en utilisant un analyseur de taille de particules VASCO de Cordouan Technologies®. Les deux échantillons ont été soniqués dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 800 µL de la dispersion de particules

a été déposé sur la cellule de mesure. L'intensité de la diode laser de 658 nm a été ajustée et l'échantillon a été refroidi passant de 127 ° C à 20 ° C. La valeur de l'indice de réfraction (1.331), de la viscosité du solvant (0.888 cP) et de l'indice de réfraction des NPs de NiO sont saisies dans le logiciel 129NanoQ qui contrôle ensuite la mesure ultérieure. Un signal en temps réel est mesuré ; 130 acquisitions sont réalisées toutes les 30 sec si le bruit du signal ne dépasse pas 1,06 % et 8 acquisitions sont réalisées pendant 16 min. Afin d'améliorer la résolution des distributions de tailles multimodales, les données de distribution de taille ont été analysées à l'aide d'un algorithme d'auto-apprentissage probabiliste, appelé Sparse Bayesian Learning (SBL) adapté aux suspensions de particules très poly-dispersées.

La charge de surface et le potentiel Zeta (ζ) ont été mesurés à l'aide d'un laser Doppler à électrophorèse et d'un analyseur de potentiel ζ de Cordouan Technologies®. Les NPs de NiO ont été dispersées à 0.2 g/L dans du KNO₃ à 1 mM. La valeur du pH de la dispersion a été ajustée avec du HNO₃ à 10 % ou de NaOH à 1 M. Six mesures ont été effectuées pour chaque valeur de pH. Puis, afin de vérifier l'influence des protéines sériques et des autres composants des milieux de culture (MBC ou L15M) qui peuvent s'adsorber sur les NPs, les NPs de NiO sont incubées 5 min à une concentration de 0.2 mg/mL dans le milieu de culture, puis le milieu de culture est centrifugé et les NPs sont dispersés dans 1mM de tampon HEPES ajusté à pH 7.4.

1.2. Internalisation des NPs de NiO

Les cellules sontensemencées dans des chambres en verre type Lab-Tek (8 puits, Dutscher, France) préalablement coatées avec de la fibronectine, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC et à 28°C pour les HEPA-E1. Les cellules sont ensuite exposées ou non avec les NPs de NiO ou les latérites à 5 ou 10 µg/cm² pendant 4 h. Puis, les cellules sont rincées avec du milieu blanc sans sérum et fixées, pendant 1 h à température ambiante (TA), avec du paraformaldéhyde (1.6 %, v/v) et du glutaraldéhyde (2 %, v/v) dans une solution tampon de cacodylate (0.08 M), pH = 7.4. Les cellules sont ensuite post-fixées, pendant 2 h sur la glace et à l'obscurité, dans un mélange contenant du tétroxyde d'osmium (1 %, v/v), du ferricyanide de potassium K₃Fe(CN)₆ (1 %, p/v) dilués dans un tampon cacodylate (0.1 M). Les échantillons sont rincés avec de l'eau et colorés dans une solution aqueuse d'acétate uranyle (0.5 %, p/v), pendant 30 min, à TA et à l'obscurité. Puis, les cellules sont rincées et déshydratées à travers un gradient d'éthanol et incorporées dans un mélange d'éthanol pur et de la résine époxy

50/50 (v/v) (Epon 812 ; Delta Microscopie, Toulouse, France), pendant 2 h, puis dans une résine pure toute la nuit à TA. La polymérisation de la résine est réalisée, pendant 24 à 48 h, à 60 °C. Les échantillons sont ensuite coupés à l'aide d'un couteau à diamant (Diatome, Biel-Bienne, Suisse) avec un ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienne, Autriche). Des coupes ultrafines (65 nm) sont récupérées sur des grilles en cuivre et colorées avec l'uranyless (Delta Microscopie, Toulouse, France) et du citrate de plomb. Les grilles sont ensuite observées avec un MET (H7650, Hitachi, Tokyo, Japon) à 80 kV (Deweirdt et al., 2017). Les traitements des cellules et l'analyse en MET sont réalisés au BIC (Bordeaux Imaging Center).

2. Évaluation du stress oxydant acellulaire des NPs de NiO

La production d'ERO en condition acellulaire est évaluée dans les milieux MBC et L15M par spectrofluorimétrie, en utilisant la sonde H₂DCF-DA (dichlorodihydrofluoresceine diacétate, acétyl ester, Fisher Scientific®). La H₂DCF-DA, non fluorescente, est oxydée par les ERO en un dérivé fluorescent, le DCF (2',7'-dichlorofluoresceine), qui peut facilement être quantifié par fluorimétrie. L'excitation de la molécule DCF à 485 nm émet une fluorescence verte directement proportionnelle à la quantité d'ERO présente, qui peut être détectée à 520 nm par un lecteur de microplaques à fluorescence (Chen et al., 2010).

Les expérimentations sont réalisées en prenant soin d'exposer le moins possible la sonde à la lumière. Afin d'évaluer la production intrinsèque d'ERO des NPs de NiO, la suspension particulaire est diluée dans de l'eau pour obtenir des concentrations de 0 à 50 µg/mL, puis déposées dans une plaque 96 puits. La sonde H₂DCFDA est solubilisée dans de l'éthanol absolu (DCFH₂-DA à 0.33 mM), puis ajoutée à une solution de NaOH à 10 mM permettant de cliver le groupement diacétate. La solution est activée pendant 30 min à TA et à l'obscurité avant d'être neutralisée par du PBS 10X. La solution obtenue est utilisée extemporanément, en prenant soin de ne pas l'exposer à la lumière. La sonde H₂DCF activée est ensuite incorporée (concentration finale : 16.5 µM) dans les puits contenant les particules (volume final : 250 µl/puits). Une gamme étalon d'H₂O₂, diluée dans un tampon Tris-HCl (40 mM, ajusté au pH 7.4), de 1 à 150 µM, est également préparée et incorporée avec la sonde H₂DFC (16.5 µM) et du sulfate ferreux FeSO₄ (50 µM). Enfin, la plaque est mise à incuber 60 min à 37 °C et 5 % CO₂. L'intensité de fluorescence est déterminée, par spectrofluorimétrie, grâce à un lecteur de plaques (FLUOstar Omega 2.10 et le logiciel d'analyse MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®), à une longueur d'onde

d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm, à 13 cycles de 600 sec à 37 °C. Les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

3. Dosage du nickel dissous dans les milieux de culture des cellules

Le nickel dissous potentiellement libéré des NPs de NiO dans le MBC et le L15M a été déterminé. Des échantillons sont prélevés après 4 h d'incubation des NPs de NiO dans les deux milieux à trois concentrations différentes (0,87 ; 4,37 et 8,75 µg/mL) en triplicats (n=3). Un volume de 2mL d'échantillon est placé dans un tube équipé d'un filtre centrifuge Amicon Ultra, Ultracel 3K, cellulose régénérée, 3 000 NMWL (Merck® Millipore). Les échantillons sont centrifugés à 7 500 g pendant 30 min. Les filtrats sont récupérés puis acidifiés par du HNO₃ à 10 % avant analyse par un spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (700 Series ICP-OES, Agilent).

4. Dosage des protéines

Pour certaines expérimentations, les résultats obtenus sont rapportés à la quantité de protéines présente dans nos échantillons. Le dosage des protéines est réalisé grâce au test de Lowry avec le kit Biorad® DC Protein assay reagent package, selon les recommandations du fournisseur. Cette technique est basée sur la réaction des protéines contenues dans les échantillons avec une solution alcaline de cuivre. La chélation des ions Cu²⁺ par les protéines entraîne leur réduction en ions Cu⁺. Les échantillons sont ensuite mis en présence du réactif de Folin en milieu acide. Ce dernier est réduit en dérivés colorés bleus en présence de différents acides aminés constitutifs des protéines et des ions Cu⁺. Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine de sérum bovin (BSA) de 0 à 2 mg/ml. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®).

5. Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité des NPs de NiO est évaluée par le test WST-1 (Water Soluble Tetrazolium), basé sur le clivage des sels de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) incolore, en un dérivé formazan, soluble de couleur jaune,

par les succinates déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes (Kit de dosage Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche®) (Mosmann, 1983).

Les cellules sont tout d'abordensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC et à 28°C pour les HEPA-E1. Puis les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (1 à 150 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 4 fois (n = 4) avec 8 puits par conditions. Après 24 h d'exposition, le milieu est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec du MBC ou du L15M. Elles sont ensuite incubées, 3 h à 37 °C, 5 % de CO₂ avec du MBC ou du L15M contenant 10 % de WST-1 (Deweirdt et al., 2017). L'absorbance est mesurée directement par spectrophotométrie à 450 nm corrigée à 630 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

6. Évaluation de l'apoptose

Les tests pour évaluer l'apoptose diffèrent en fonction du type cellulaire, en effet l'Annexin / IP n'a pu être réalisé sur les HEPA-E1 en raison d'un défaut de marquage de la sonde sur les hépatocytes. La production de la caspase 9 a alors été choisie pour évaluer l'apoptose sur les HEPA-E1.

6.1. Annexin V / Iodure du propidium dans les cellules HPAEC

Le kit Annexin V Apoptosis Detection APC (Fischer Scientifique, Illkirch, France) est utilisé pour détecter le nombre de cellules apoptotiques et nécrotiques dans les cultures de cellules HPAEC après exposition avec les NPs de NiO. Dans ce kit, l'Annexin V est couplée à l'allophycocyanine (APC).

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h, à 37 °C, 5 % de CO₂. Puis les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 10 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 3 puits par condition. Après 24 h d'exposition, le milieu est retiré et gardé, le tapis cellulaire rincé puis les cellules sont dissociées avec le DetachKit (PromoCell®). L'ensemble ensuite est centrifugé 5 min à 4 °C et 3 000 g, puis le culot est rincé deux fois avec du PBS 1 X. Enfin, les culots sont resuspendus dans 100 µl

de solution tampon (fournie par le kit), 5 μ l d'Annexin V-APC et 5 μ l d'iodure de propidium dans des tubes FACS. L'échantillon est agité puis incubé à TA, dans le noir, pendant 15 min. 100 μ l de solution tampon sont rajoutés puis l'analyse au cytomètre est faite dans l'heure qui suit. Les résultats sont analysés sur Diva puis GraphPad.

6.2. Production de la caspase 9 dans les cellules HEPA-E1

La production de la caspase 9, marqueur de la voie de l'apoptose intrinsèque dans les cellules, est déterminée grâce à la sonde fluorescente caspase 9 (Green caspase 9 indicator, ImmunoChemistry Technologies®) dans les cultures de cellules d'HEPA-E1. Ce test *in vitro* utilise la sonde inhibitrice fluorescente FAM-LEHD-FMK pour marquer l'enzyme de la caspase-9 active dans les cellules vivantes. La fluorescence de la sonde est mesurée au microscope confocal. Une fois excitée à 488 nm, la sonde émet une fluorescence à 515 nm dont l'intensité est proportionnelle à l'activité de la caspase 9 donc à la quantité de caspase 9 active dans les cellules. Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 72 h, à 28 °C. Avant l'exposition les cellules sont rincées avec du L15M. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 24 h avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 μ g/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 6 puits par concentration. Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs (composition décrite en 1). Les cellules sont ensuite incubées, pendant 30 min., dans une étuve à 28 °C à l'abri de la lumière, avec la sonde Caspase 9 (150X) diluée dans du MAC-Krebs. Les puits sont vidés puis rincés avec 100 μ L de MAC-Krebs par puits, puis 100 μ L de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007.

7. Evaluation du stress oxydant cellulaire

7.1. Evaluation des ERO globale par la sonde CM-H₂DCF-DA

Les différentes ERO produites dans les HPAEC ont été quantifiées, par spectrofluorimétrie, en utilisant la sonde CM-H₂DCF-DA (5-(and-6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate, acétyl ester), Fisher Scientific®). La CM-H₂DCF-DA, non fluorescente à l'état acétylé et réduit, est clivée au niveau des groupements acétylés en 2' et 7' par des estérases pour donner la H₂DCF non fluorescente. La molécule est ensuite oxydée par les ERO en un dérivé fluorescent, le DCF, qui peut facilement être quantifié par fluorimétrie. L'excitation de la molécule DCF à 485 nm émet une fluorescence verte proportionnelle à la quantité d'ERO présente, qui peut être détectée à 520 nm par un lecteur de microplaques à fluorescence (figure 43). Ainsi, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ERO formées dans la cellule (Chen et al., 2010).

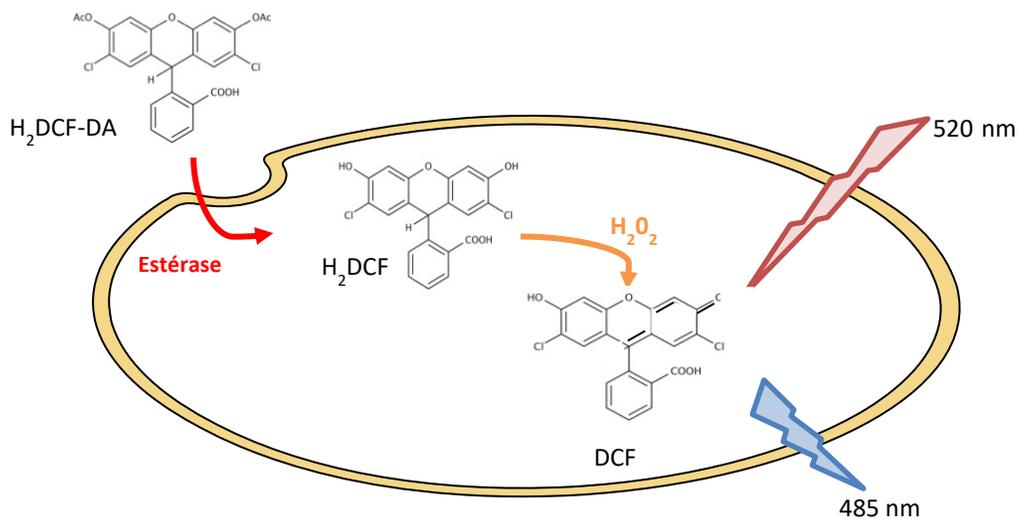


Figure 43 : Mécanisme d'action de la sonde CM-H₂DCF-DA

Les expérimentations sont réalisées en prenant soin d'exposer le moins possible la sonde et les cellules à la lumière. Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec une solution de milieu blanc sans sérum (MBSS). Les cellules sont ensuite incubées, pendant 20 min. à 37 °C, 5 % de CO₂, avec la sonde (20 µM) solubilisée dans du MBSS. Après avoir retiré la sonde non incorporée, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec

différentes concentrations de NPs de NiO (0.25 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 5 fois ($n = 5$) avec 3 puits par condition. Un contrôle positif est réalisé en exposant les cellules avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 1 mM. Après 2 à 24 h d'exposition, l'intensité de fluorescence est déterminée, par spectrofluorimétrie, grâce à un lecteur de plaques (FLUOstar Omega 2.10 et le logiciel d'analyse MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®), à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm. Les résultats sont analysés par Excel et GraphPad.

7.2. Dosage de l'anion superoxyde cytoplasmique par résonance paramagnétique électronique

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique qui permet de connaître la qualité et la quantité des espèces magnétiques d'un échantillon. C'est une technique sensible et spécifique qui permet une détection directe de toute espèce paramagnétique, caractérisée par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence. Cette technique permet ainsi de mesurer des radicaux libres (OH^\cdot , $\text{O}_2^\cdot-$). Les électrons d'un atome sont en rotation autour d'un noyau atomique mais également en rotation sur eux-mêmes, c'est la notion de « spin ». Le « spin » permet la mise en place d'un champ magnétique où les électrons se comportent comme des petits aimants. Lorsque les électrons d'une molécule s'apparient, les champs magnétiques associés s'annulent, en revanche, si le nombre d'électrons est impair, il y a un électron non apparié. Les radicaux se comportent à leur tour comme des petits aimants. Le principe de base de la RPE repose sur la propriété des électrons non appariés, lorsque qu'ils sont placés dans un champ magnétique extérieur intense B_0 , à absorber puis réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique $h\nu$ perpendiculaire à B_0 et d'amplitude plus faible. Les espèces radicalaires (OH^\cdot , $\text{O}_2^\cdot-$) ont une demi-vie trop courte pour pouvoir être détectées directement, nécessitant donc une stabilisation préalable. L'utilisation de « spin probe » tel que le CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tetraméthyl-pyrrolidine) permet de former, en présence d' $\text{O}_2^\cdot-$, un radical nitroxyde (CM^\bullet) stable avec une demi-vie de plusieurs heures, qui peut être facilement détecté par spectroscopie RPE. Cette sonde a la propriété d'être liposoluble, ce qui permet de mesurer l' $\text{O}_2^\cdot-$ extra et intracellulaire. Le spectre d'absorption obtenu (forme, position, ...) est caractéristique de l'élément magnétique dosé. Pour l' $\text{O}_2^\cdot-$, le

radical nitroxyde CM^\bullet entre en résonance lorsque B0 a une intensité aux alentours de 335 mT. L'amplitude de la variation d'absorption correspond à la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ générée (Deschacht et al., 2010). Les échantillons sont mis en présence d'un mélange « spin probe » qui contient la sonde CMH en excès afin de piéger l' $O_2^{\cdot-}$, ainsi que du diéthylthiocarbamate de sodium (DETC) et de la déféroxamine (DF) (deux antioxydants) afin que la sonde CMH soit oxydée uniquement par l' $O_2^{\cdot-}$. La DF, en tant que chélateur du fer, inhibe l'auto-oxydation de la sonde CMH catalysée par les traces de métaux de transition présentes dans l'échantillon. Le DETC, un chélateur de cuivre, empêche l'auto-oxydation de la sonde CMH et en même temps la dégradation de l' $O_2^{\cdot-}$ par la SOD Cu/Zn.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec une solution de MBC ou de L51M. Les cellules sont ensuite intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 3 puits par condition. Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec une solution de KHB préalablement bullée à l'azote. Les cellules sont ensuite incubées 20 min à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1 avec le mélange de « spin probe » (500 µL par puits) composé de 40 µL de DETC (500 µM, Sigma®), 40 µL de DF (2,5 mM, Sigma®) et 80 µL de CMH (50 mM, Noxygen®) dans 3840 µL de KHB bullé à l'azote. Après 20 min, les cellules sont grattées, la suspension cellulaire homogénéisée (sans faire de bulles) et les surnageants sont aspirés dans une seringue. La réaction est arrêtée en congelant immédiatement les seringues dans l'azote liquide (-196 °C). Elles sont ensuite stockées à - 80 °C. Pour la lecture des échantillons, les seringues sont transportées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont placés dans un Dewar qui est ensuite introduit dans le résonateur (chambre de lecture). Le logiciel Miniscope est organisé en deux interfaces : « Control 6.51 » et « Analysis 2.02 ». La partie « Control 6.51 » est connectée au spectromètre à bande X Miniscope MS200 (Magnetech, Berlin), et il est utilisé pour le réglage des paramètres et l'acquisition des spectres. Les paramètres sont les suivants : B0 field: 3339,4 G; B0 sweep: 293,84 G; Sweep time: 60 sec; Modulation amplitude: 0,5; Modulation frequency: 100 kHz ; Modulation: 5000 mG ; MW atten : 10 dB ; Samples: 4096 steps, Gain: 100 ; Number (pass): 3. Les spectres sont analysés avec le

module « Analysis 2.02 ». L'amplitude de chaque pic est quantifiée, puis la moyenne des 3 pics des 3 lectures est calculée et reportée dans un tableau Excel. Une fois la lecture au spectromètre effectuée les échantillons sont récupérés dans des eppendorfs puis conservés à -20 °C, afin d'effectuer la normalisation des pics par rapport à la quantité de protéines.

Les spectres de RPE sont analysés avec le module « Analysis 2.02 ». L'amplitude de chaque pic est quantifiée et reportée dans un tableau Excel. Le dosage des protéines permet de normaliser les résultats de la moyenne des pics observés en RPE (UA = unité arbitraire). Les analyses des résultats du test de Lowry sont faites sur Excel et GraphPad. Les résultats sont exprimés en UA/(mg/ml).

7.3. Dosage de l'anion superoxyde mitochondrial par microscopie confocale

La sonde fluorescente MitoSOX (Red mitochondrial superoxide indicator, ThermoFischer®) est utilisée pour mesurer la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans les mitochondries des cellules vivantes. L'oxydation de la sonde MitoSOX par l' $O_2^{\cdot-}$ produit une fluorescence rouge (Ahmed et al., 2012, Bkaily et al., 2017). La fluorescence de la sonde est mesurée au microscope confocal. Une fois excitée à 510 nm, la sonde émet une fluorescence à 580 nm dont l'intensité est proportionnelle au taux d'oxydation de la sonde. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC ou du L15M. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 6 puits par conditions (Deweirdt et al., 2017). Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde MitoSox (5 µM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 30 min, dans une étuve à 37 °C, à l'abri de la lumière. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec 100 µL de MAC-Krebs par puits puis 100 µL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à

immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 510 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007 et les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution de production par rapport aux témoins.

8. Évaluation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase

La SOD est une enzyme anti-oxydante qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et O_2 . L'activité de la SOD est déterminée par une méthode indirecte, grâce au kit de dosage SOD determination (Sigma-Aldrich®), selon les recommandations du fournisseur. Le principe de cette méthode est basé sur la réduction du WST-1 en formazan suite à la transformation de l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$. Le taux de réduction du WST-1 est proportionnel à l'activité de la xanthine oxydase (XO), enzyme inhibée par la présence de la SOD (figure 44).

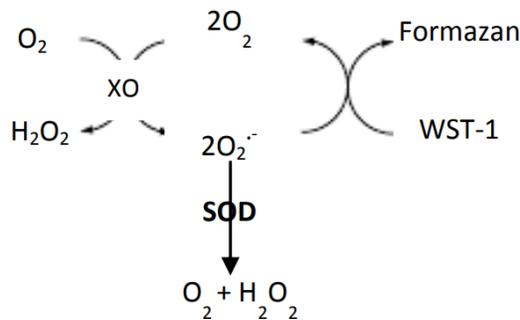


Figure 44 : Mécanisme de détection indirecte de l'activité enzymatique de la SOD, Kit 19160 Sigma-Aldrich®

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 20 000 cellules/cm², pendant 24 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du milieu blanc. Les cellules sont ensuite intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 3 puits par condition. Après 24 h d'intoxication, les surnageants, contenant la SOD extracellulaire sécrétée, sont récupérés et centrifugés 10 min à 15 000 g, 4 °C. Le tapis cellulaire, contenant la SOD intracellulaire, est rincé une fois avec du PBS 1X, puis gratté dans 1 mL de PBS 1X. Les suspensions cellulaires sont récupérées puis centrifugées 10 min à 2 000 g, 4 °C. Les culots sont remis en suspension dans 1 mL de PBS 1X puis à nouveau centrifugés. La même étape est réalisée une seconde fois. Les cellules sont ensuite lysées par sonication, trois fois, pendant 30 sec à 100 Hz, à l'aide d'un

sonicateur avec une sonde à induction, puis centrifugées pendant 15 min à 10 000 g, à 4 °C. Le surnageant est récupéré. L'absorbance dans les surnageants et dans les lysats cellulaires est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 450 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés par Excel et GraphPad.

9. Évaluation de la réponse pro-inflammatoire : dosage des interleukines-6

La quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-6 a été étudiée après 24 h d'intoxication avec les NPs de NiO.

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 12 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 6 fois (n = 6) avec 3 puits par condition. Après 24 h d'exposition, les surnageants sont prélevés, centrifugés (10 min à 15 000 g et 4 °C) et conservés, à -20 °C, jusqu'au dosage. Le dosage des cytokines IL-6 dans les surnageants de culture est effectué par la technique d'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) en utilisant le kit Duoset (R&D Systems®), selon les recommandations du fabricant, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont ensuite analysés sur Excel et GraphPad.

10. Évaluation du calcium intracellulaire

10.1. Mesure du calcium cytoplasmique

La sonde calcique fluorescente Fluo-4-AM (1-[2-amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthényl)phenoxy]-2-(2-amino-5-méthylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tétraacétique acid, pentaacétoxyméthyle ester) (ThermoFisher®) qui permet de chélater le calcium a été utilisée pour mesurer les variations du taux de calcium cytoplasmique. Sous sa forme Fluo-4-AM, la fonction acétoxyméthyle (AM) lui permet de rentrer dans les cellules depuis le milieu extracellulaire. Une

fois incorporée dans les cellules, la fonction AM est clivée par des estérases endogènes, donnant la forme Fluo-4, piégée dans le cytoplasme et dont la fluorescence est sensible au calcium. La sonde Fluo-4 a un Kd de 345 nM ce qui lui permet d'être sensible aux variations de Ca^{2+} intracellulaire qui vont généralement de 50 nM à 1 μM . Une fois excitée à la longueur d'onde appropriée (494 nm), la sonde émet une fluorescence à 516 nm dont l'intensité varie avec la liaison du Ca^{2+} à la sonde. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de calcium cytoplasmique.

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation a été reproduite 3 fois (n = 3) avec 6 puits par condition (Deweirdt et al., 2017). Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde Fluo-4-AM (2 μM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 30 min, dans une étuve à 37 °C à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 μL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 510 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007, les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution de la concentration calcique par rapport aux témoins.

10.2. Mesure du calcium mitochondrial

Les variations de calcium mitochondrial sont mesurées à l'aide de la sonde Rhod-2-AM (Euromedex). La sonde Rhod-2 a un Kd de 570 nM. Rhod-2 possède une charge positive, ce qui lui permet de s'accumuler dans les mitochondries qui ont un potentiel de membrane interne chargé négativement, proche de -150mV. Une fois excitée à la longueur d'onde appropriée (543 nm), la sonde émet une fluorescence à 605 nm dont l'intensité varie avec la liaison du Ca^{2+} à la sonde.

L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de calcium mitochondrial (Hajnoczky et al., 1995).

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 6 puits par condition (Deweirdt et al., 2017). Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde Rhod-2-AM (1 µM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 20 min, dans une étuve à 37 °C, à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 µL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 543 nm et l'émission est enregistrée à 605 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007, les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution de la concentration calcique par rapport aux témoins.

10.3.Mesure du calcium du réticulum endoplasmique

Les variations de calcium dans le réticulum endoplasmique (RE) sont mesurées à l'aide de la sonde Fluo-4FF-AM (ThermoFisher®). La sonde Fluo-4FF a un Kd de 9.7 µM, ce qui lui permet d'être sensible aux variations de calcium plus élevées dans le RE. La fluorescence de la sonde augmente lors de la liaison au Ca²⁺. Une fois excitée à la longueur d'onde appropriée (488 nm), la sonde émet une fluorescence à 515 nm dont l'intensité varie avec la liaison du Ca²⁺ à la sonde. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de calcium réticulaire (Tauskela et al., 2001).

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole

décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois ($n = 3$) avec 6 puits par condition (Deweirdt et al., 2017). Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde Fluo-4FF (10 μM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 20 min, dans une étuve à 37 °C, à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 μL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007, les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution de la concentration calcique par rapport aux témoins.

11. Évaluation du monoxyde d'azote et des nitrites et nitrates

11.1. Mesure du monoxyde d'azote (NO) au microscope confocal

La détection et la quantification des concentrations de NO sont mesurées à l'aide de la sonde DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate) (ThermoFischer®). La sonde DAF-FM est non fluorescente. Après sa réaction avec le NO, elle forme un dérivé de benzotriazole fluorescent (Li et al 2003). L'intensité fluorescente de la sonde DAF-FM est directement proportionnelle à la quantité de NO présente dans les cellules.

Les cellules sont tout d'abordensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/ cm^2 et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO_2 . Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 ou 24 h avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois ($n = 3$) avec 6 puits par condition. Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde DAF-FM (5 μM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 30 min dans une étuve à 37 °C à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 μL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile

à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution de la production de NO par rapport aux témoins.

11.2. Dosage des métabolites du NO, les nitrites et les nitrates

Le NO étant très instable dans les solutions physiologiques, une majorité du NO peut être transformé en différents métabolites tels que les nitrites (NO_2^-), les nitrates (NO_3^-) et les peroxy-nitrites (ONOO^-). Le NO peut réagir avec différentes molécules telles que l'O_2 , l'O_2^- ou encore le dioxygène d'azote (NO_2). Après la réaction du NO avec l'O_2^- , la concentration de NO_3^- est directement proportionnelle à la concentration d' ONOO^- , elle-même dépendante de la concentration de NO. Le test de Griess, permet de quantifier la concentration de NO_2^- basal et la concentration totale de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ produits. Ces données permettent ainsi de calculer la quantité de NO_3^- , à l'aide de l'enzyme nitrate réductase et le cofacteur de la nitrate réductase.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 20 000 cellules/cm², pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) pendant 24 h selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 3 puits par condition. Afin d'éliminer les débris cellulaires et les particules, les surnageants sont récupérés puis centrifugés, 10 min à 11 000 g et 4 °C. Le dosage des nitrites et des nitrates est effectué par la technique du réactif de Griess grâce au kit « Griess Reagent Kit for nitrite determination » (Invitrogen®), selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés avec Excel et GraphPad.

12. Dosage de l'endothéline-1

La quantification du facteur vasoconstricteur endothéline-1 (ET-1) a été étudiée, dans les cellules HPAEC, après 24 h d'intoxication avec les NPs de NiO.

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 12 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂. Avant l'intoxication, le tapis

cellulaire est rincé deux fois avec du MBC et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation a été reproduite 6 fois ($n = 6$) avec 3 puits par condition. Après 24 h d'exposition, les surnageants sont prélevés, centrifugés (10 min à 15 000 g et 4 °C) et conservés, à -20 °C, jusqu'au dosage. Le dosage de l'ET-1 dans les surnageants de culture est effectué par la technique d'ELISA en utilisant le kit Endothelin-1 (kit ELISA Endothelin-1, Enzo Life Sciences®), selon les recommandations du fabricant, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont ensuite analysés sur Excel et GraphPad.

13. Évaluation de la fonction mitochondriale

13.1. Mesure du potentiel de membrane mitochondriale

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial (Ψ_{MM}) a été faite à l'aide d'une sonde cationique lipophile (perméable à la membrane) : le tétraméthylrhodamine, méthyl ester (TMRM) (ThermoFischer®). Il s'agit d'une sonde de la famille des rhodamines qui est séquestrée par les mitochondries actives. En raison du potentiel de membrane très négatif de la membrane interne des mitochondries, le TMRM s'accumule préférentiellement dans la mitochondrie par rapport au cytoplasme. Plus le potentiel de membrane est négatif, plus la sonde se fixe dans les mitochondries (Scaduto RC et al. 1999). La fluorescence émise varie en fonction du potentiel mitochondrial. L'intensité fluorescente de la sonde TMRM est directement proportionnelle au Ψ_{MM} , plus il est négatif, plus la fluorescence émise est élevée.

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules/ cm^2 et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO_2 pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois ($n = 3$) avec 6 puits par condition. Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde TMRM (100 nM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 30 min, dans une étuve à 37 °C, à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 μL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope

confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 543 nm et l'émission est enregistrée à 605 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation ou de diminution du potentiel de membrane mitochondrial par rapport aux témoins.

13.2. Mesure de la masse mitochondriale

La masse mitochondriale a été évaluée en utilisant la sonde MitoTracker Green (ThermoFischer®). Cette sonde, qui possède un demi-groupement chlorométhyle thiol réactif, diffuse de manière passive à travers la membrane plasmique et les membranes des organites. Par un processus de conjugaison à des protéines mitochondriales, via son groupement thiol, la sonde reste piégée dans les mitochondries. La sonde initialement réduite n'est pas fluorescente. Elle s'oxyde une fois dans les mitochondries et émet, ensuite, de la fluorescence. Cela permet de visualiser en direct la dynamique mitochondriale (fission/fusion par exemple).

Les cellules sontensemencées, dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 37 °C, 5 % de CO₂ pour les HPAEC ou à 28°C pour les HEPA-E1. Avant l'intoxication, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC ou du L15M et les cellules sont intoxiquées avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. L'expérimentation est reproduite 3 fois (n = 3) avec 6 puits par condition. Après l'intoxication avec les différentes concentrations de NPs de NiO, les cellules sont rincées avec une solution physiologique MAC-Krebs. Les cellules sont ensuite incubées avec la sonde Mitotracker (1 µM) diluée dans du MAC-Krebs, pendant 30 min dans une étuve à 37 °C, à l'obscurité. Les puits sont ensuite vidés puis rincés avec du MAC-Krebs puis 100 µL de la solution MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont analysées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocale Eclipse, Nikon) et observées au grossissement X 200, avec de l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm à raison de 3 images par puits. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007.

14. Évaluation de l'expression des gènes

14.1. Etudes en qPCR pour les cellules HPAEC

La PCR quantitative (quantitative polymerase chain reaction) à transcription inverse (RT-qPCR) est utilisée pour déterminer les niveaux de transcription de l'ARNm. L'extraction des ARN à partir des cellules HPAEC est réalisée avec le Kit de purification NucleoSpin® RNA Plus Protocole, Macherey-Nagel, selon les indications du fournisseur. Les cellules sont tout d'abordensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées pendant 24 h, à 37 °C, 5 % de CO₂. Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 24 h, avec différentes concentrations de NPs de NiO (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1 X puis lysées dans 350 µL de Buffer LBP (Lysis Buffer Protein). Après extraction des ARN totaux selon les recommandations du fournisseur (NucleoSpin® RNA Plus Protocole, Macherey-Nagel), la reverse transcription est réalisée à l'aide d'une reverse transcriptase (Sigma®) grâce à un appareil CFX96 permettant d'obtenir l'ADNc nécessaire à la qPCR. La PCR quantitative permet de mesurer en temps réel le niveau d'expression des transcrits amplifiés. L'amplification des gènes est effectuée à partir de 215 à 300 ng d'ADNc totaux à l'aide des paires d'amorces (2 µM) des gènes IL-6, bcl-2 et TRPV4 (Sigma®), du SYBR Green Supermix (905053 Quantabio) et de la Taq-titanium polymérase (Sigma®). Les gènes de ménage choisis pour les expériences sont RPL13 (Ribosomal protein L 13), GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et Gusb (β-glucuronidase). Les échantillons sont maintenus à 95°C pendant 2 min, suivis de 39 cycles d'amplification comprenant une étape de déstructuration, à 95°C, pendant 10 sec et d'une étape de polymérisation, à 60°C, pendant 30 sec, puis pendant 5 sec à 65°C. La quantification relative de l'expression de chaque gène a été normalisée en fonction des gènes de référence et générée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par (Livak and Schmittgen, 2001). Ceci correspond au ratio des Ct du gène cible sur le Ct de son gène de ménage, suivie d'une normalisation par le ratio du gène cible chez les contaminés par rapport au même gène chez les témoins. Les séquences des amorces utilisées sont présentées ci-dessous :

Tableau 7 : Séquences des gènes étudiés dans les HPAEC

Nom du gène	Gène	Séquence sens	Séquence anti-sens
interleukine-6	<i>il-6</i>	5'-ACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	5'-TGGAAGCATCCATCTTTTC-3'
B-cell lymphoma 2	<i>bcl - 2</i>	5'-GGCCTTCTTTGAGTTCGGTG-3'	5' CATCCCAGCCTCCGTTATCCTG 3'
transient receptor potential vanilloïde 4	<i>trpv4</i>	5'-CGCAAGTGGAGGACTGATGA-3'	5'-TAGAAATGAGTGGGAGAGAGAAGCT-3'
ribosomal protein l13	<i>rpl13</i>	5'-GGGAGCAAGGAAAGGGTCTTA-3'	5'-CACCTGCAAATTCTCCGAGT-3'
glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<i>gapdh</i>	5'-CACATGGCCTCCAAGGAGTAA-3'	5'-TGAGGGTCTCTCTTCTTCTTGT-3'
β-glucuronidase	<i>gusb</i>	5'-TGAAATCGGCAAAATTCCAAT-3'	5'-CCATCTGGGTCTGGATCAAAA-3'

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager, version 3.1, puis avec Excel et GraphPad.

14.2. Etudes en qPCR pour les HEPA-E1 et les échantillons d'*Anguilla marmorata*

La PCR quantitative à transcription inverse (RT-qPCR) est utilisée pour déterminer les niveaux de transcription de l'ARNm, d'une part, chez les poissons échantillonnés *in situ* en 2021 dans 6 organes différents et, d'autre part, sur les cellules HEPA-E1. Les HEPA-E1 sont cultivées dans des plaques 12 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées pendant 48 h, à 28 °C puis intoxiquées (0.5 à 5 µg/cm²) selon le protocole décrit dans la Partie 1, paragraphe 4. Pour les anguilles échantillonnées *in situ*, les tissus sont stockés dans du RNA later immédiatement après dissection, puis conservés à -20°C, après une nuit à 4°C, jusqu'aux analyses.

Afin d'obtenir les séquences codantes des gènes cibles, les séquences d'ADNc provenant du transcriptome assemblé de *A. anguilla* (Perrier et al., 2020, Coppe et al., 2010) ont été alignées avec le génome assemblé de *A. marmorata* ou *A. japonica* en utilisant le programme Blast. Les séquences présentant des homologies élevées entre *A. anguilla* et *A. marmorata*, les séquences d'*A. anguilla* sont utilisées pour concevoir des amorces spécifiques pour les poissons échantillonnés *in situ*. La même procédure a été appliquée pour les HEPA-E1 à partir de séquences

proches entre *A. anguilla* et *A. japonica*. Ceci a été réalisé à l'aide du logiciel primer3plus (Untergasser et al., 2007) (Tableaux 6 et 7).

L'extraction de l'ARNm total est effectuée à l'aide d'un NucleoZOL (isolation de l'ARN, nucleoZOL, Marcherey-nagel®, USA) disponible dans le commerce, conformément aux recommandations du fabricant. La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit de transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) (Promega). Enfin, les réactions PCR sont réalisées à l'aide d'un LC480 (Roche), à 95°C pendant 2 min, suivi de 45 cycles de 95°C, pendant 15 sec et 60°C, pendant 1 min. Chaque réaction de 15 µL contenait 7,5 µL de mélange maître GoTaq qPCR (Promega), 5 µL de matrice et les paires d'amorces spécifiques à une concentration finale de 200 nM chacune. La spécificité de la réaction est déterminée pour chaque réaction à partir de la courbe de dissociation du produit PCR. Les gènes de la protéine ribosomale L7 (*rpl7*) et de la β -actine (*β -act*) ont été utilisés comme gènes de référence pour *Anguilla marmorata* et le gène elongation factor-1 α (*ef-1 α*) en plus pour *Anguilla japonica*. La quantification relative de l'expression de chaque gène est normalisée en fonction des gènes de référence et générée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par (Livak and Schmittgen, 2001). Les séquences des amorces utilisées sont présentées ci-dessous :

Tableau 8 : Séquences des gènes étudiés chez *Anguilla marmorata*

Nom du gène	Code du gène	Séquence sens	Séquence antisens
ribosomal protein l7	<i>rpl7</i>	5'-GCATCTGGGCAATTACCATT -3'	5'-CAAGGAAGTGGCTACCAAGC -3'
β -actin	<i>β-actin</i>	5'-CTCTATCGTCCACCGCAAAT -3'	5'-CACCTTCACCGTTTTCCAGT-3'
clathrin b	<i>cltb</i>	5'-GCAGAAGTCCCATAGGTCCA -3'	5'-AACACCGGAAGCGTAATGTC-3'
superoxide dismutase zinc/cuivre	<i>sod_{zn/cu}</i>	5'-TCAAGGACAGAATGCTCACG -3'	5'-TGCTTTTGGGACACCCTTAC -3'
superoxide dismutase manganese	<i>sod_{mn}</i>	5'-CGCCACATATGTCAACAACC-3'	5'-TAGGGGACAGGTTTGTCCAG-3'
metallothioneine	<i>mt</i>	5'-CGAGCTGCTGTCTAGTGAAGA -3'	5'-GCTCTGCATGGATGACAAAA-3'
ribosomal rna 12s	<i>12S</i>	5'-CTCACCATCCCTTGCTAAA -3'	5'-CTCAGAGCCGGTTTCAAAG-3'
cyclooxygenase1	<i>cox1</i>	5'-CCAGATGCATACCCCTGTG -3'	5'-CGAATGTGTGGTATGGTGA -3'
mitochondrially encoded atp synthase membrane subunit 6-8	<i>atp6-8</i>	5'-TGAGTCCCAATATGACTCG-3'	5'-ATGGCCTGCTGTTAGGTTTG-3'
acetyl-coa carboxylase	<i>acc</i>	5'-GAGCAGTACAAGCCCGACAT -3'	5'-AGCATGGTACCAGGATGTT -3'
triglyceride lipase	<i>tgl</i>	5'-GACGCTGTTGTTCCAGATGA -3'	5'-GGGAACACGTACGAAGCCTA-3'
glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	<i>gapdh</i>	5'-TCTTTTGGGGATCAAACCTG -3'	5'-TGGCCTCAAAGGAGTAGAGC -3'
vitellogenin	<i>vtg</i>	5'-CAGCTGCTTCTCAGCACAAG-3'	5'-AGCCTGAAGAACTGGCAGAA-3'
bcl-2-associated x protein	<i>bax</i>	5'-GCGACCCTAACCACAAGAAG-3'	5'-GTCAAGCTCGTCTCCGATTT-3'
tumor protein 53	<i>p53</i>	5'-GAGCCCAAGAAAGGGAAAAG -3'	5'-GACATGGAAGTACCCCAAC-3'
growth arrest and dna damage-inducible 45	<i>gadd45</i>	5'-CCGTTGTTGTCCACTGTGTC-3'	5'-GATGAGGAAGACGAGGACGA -3'
nlr family card domain containing 3	<i>nlr3</i>	5'-CCTCCAGAGTCCGTGTTAGC-3'	5'-TGCGCTTCTGTCTGGTATG-3'

Tableau 9 : Séquences des gènes étudiés dans les hépatocytes d'*Anguilla japonica*

Nom du gène	Code du gène	Séquence sens	Séquence antisens
elongation factor-1 α	<i>ef1-α</i>	5'- GGCTGGTGGTGTAGGTGAGT -3'	5'- TAAGCGCTGACTTCCTTGGT -3'
ribosomal protein l7	<i>rpl7</i>	5'- CCATTTTAAATAAATGCAACACCA - 3'	5'- GCCCAAGTCAACAGCTCGTA -3'
β -actin	<i>β-actin</i>	5'- TGC GTGACATCAAGGAGAAG -3'	5'- CAGGACTCCATACCCAGGAA -3'
Caveoline 2	<i>cav2</i>	5'- GGCCATCCTCATTTTCAGTTG -3'	5'- TTGTGATTCCAGCGGTACAA -3'
Clathrin a	<i>clta</i>	5'- TGTTGTGTGTGCAGACATGC -3'	5'- CTGAAGTGTGTGGCTGCTGT -3'
superoxide dismutase zinc/cuivre	<i>sod_{zn/cu}</i>	5'- GACAACACAAATGGCTGCAT -3'	5'- CGTGAGCATTCTGTCTTGA -3'
catalase	<i>cat</i>	5'- CGGTCAGGAGAGCCAGTAAG -3'	5'- ATGAAGCCTCTCTCCCCATT -3'
metallothioneine	<i>mt</i>	5'- GCTCTGCATGGATGACAAAA -3'	5'- CGAGCTGCTGTCTAGTGAAGA -3'
cyclooxygenase1	<i>cox1</i>	5'- GCAATGATGGCTATCGGACT -3'	5'- CAAGCCCCGACTGTAATA -3'
mitochondrially encoded atp synthase membrane subunit 6-8	<i>atp6-8</i>	5'- ACCAATTCATAAGCCCCACA -3'	5'- CCCCAACATTTAGTGGGAGA -3'
acetyl-Coa carboxylase	<i>acc</i>	5'- ATCGACATGTACGGACACCA -3'	5'- CAATGCAGAGTACGCGATGT -3'
bcl-2-associated x protein	<i>bax</i>	5'- GCGACCCTAACCACAAGAAG -3'	5'- GTC AAGCTCGTCTCCGATTT -3'

15. Dosage des métaux

Les échantillons biologiques des anguilles du Pacifique prélevées sur le terrain ont été récupérés afin de pouvoir doser la concentration en métaux dans chacun des organes. Cinq organes ont été analysés : les reins, les muscles, les branchies, le foie et le cœur.

Après dissection des anguilles *in situ*, les tissus sont placés dans des sachets plastiques conservés à 4°C jusqu'au retour au laboratoire. Les organes frais sont ensuite pesés puis séchés à l'étuve (72 h à 50 °C) à l'Université de Nouméa au sein du laboratoire ISEA (Institut des Sciences Exactes et Appliquées), puis transportés secs à EPOC. Une fois sur place les échantillons sont de nouveau séchés (24 h à 50 °C) puis broyés en une poudre finement homogénéisée à l'aide d'un mortier en agate puis pesés. Ils sont enfin digérés avec 1,5 mL d'acide nitrique à 20 %, à 200°C, pendant 15 min (méthode de digestion acide par micro-ondes - MARS 6, CEM, méthode "Tissu de poisson"). Après la minéralisation, 1,5 mL d'eau ultra-pure (Milli-Q, Bedford, MA, USA) sont ajoutés à chaque échantillon. Cinq métaux sont analysés simultanément par un spectromètre d'émission optique à plasma à couplage inductif (700 Series ICP-OES, Agilent) : nickel (Ni), cobalt (Co), cuivre (Cu), chrome (Cr), manganèse (Mn) et fer (Fe).

Les matériaux de référence certifiés DOLT-5 (foie de roussette, *Squalus acanthias*), TORT-3 (hépatopancréas de homard) et IAEA-413 (algues) ont été analysés selon la même méthodologie

que les échantillons d'anguille. Leurs taux de récupération varient entre $86,16 \pm 1,29$ et $100,37 \pm 5,08$ %. Les concentrations de métaux sont exprimées en mg.kg^{-1} de poids sec (dw).

Pour les valeurs inférieures à la limite de détection de l'instrument, des valeurs de concentration minimale théorique en $\mu\text{g/g}$ ont été calculées (la limite de détection de l'instrument (en $\mu\text{g.L}$) multipliée par le volume de l'échantillon (en L) divisée par le poids de l'échantillon (en g)).

16. Analyses statistiques

Pour chaque expérimentation, les résultats sont exprimés en moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Chaque expérimentation a été réalisée 3 à 6 fois (n indique le nombre d'expérimentation, $n = 3$ à $n = 6$), indépendamment les unes des autres pour les expérimentations *in vitro*. Pour les prélèvements *in situ*, le n correspond au nombre d'échantillons prélevés, chaque échantillon provenant d'un individu différent.

La significativité des différences entre les moyennes des cellules HPAEC ou HEPA-E1 témoins et celles des cellules HPAEC ou HEPA-E1 intoxiquées avec les NPs de NiO, le NiCl_2 ou les particules de latérites est évaluée à l'aide de différents tests. Pour comparer deux échantillons indépendants, si $n < 30$, un test non paramétrique (Mann – Whitney) est réalisé. Pour comparer plusieurs échantillons indépendants, si $n > 30$ et que l'échantillon suit une distribution gaussienne (test de Shapiro-Wilk effectué), un test paramétrique (ANOVA) suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé. Si $n < 30$ et que l'échantillon ne suit pas une distribution gaussienne, un test non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn est réalisé. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) et $p < 0.0001$ (****).

Toutes les analyses sont effectuées avec le logiciel GraphPad Prism 5.0 pour les analyses statistiques et l'obtention des graphes.

RESULTATS

Objectif 1 : Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des NPs de NiO et des latérites nickélifères sur des cellules en culture *in vitro* ?

1. Cellules vasculaires pulmonaires humaines exposées aux NPs de NiO : Altération de la signalisation calcique et de la fonction mitochondriale induite par les NPs de NiO sur des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine impliquant le stress oxydant et une dysfonction des canaux calciques TRPV4

Contexte :

Les particules qui font l'objet de notre étude sont des NPs de NiO. Ces particules ainsi que les PUF, sont émises dans l'atmosphère en Nouvelle-Calédonie notamment via, l'érosion des sols ultramafiques, les exploitations minières à ciel ouvert, et, les usines de raffinerie de Ni présentes sur l'île (Isnard et al., 2016, Pasquet et al., 2016a, Losfeld et al., 2015). La demande constante mondiale de Ni dans le monde contribue à l'augmentation de ces émissions et, par conséquent, à l'augmentation du risque d'inhalation des particules par les travailleurs et les populations environnantes. Les risques de cancers pulmonaires chez les travailleurs sont aujourd'hui connus (Andersen and Svenes, 1989, Norseth, 1994). De plus, des études récentes ont montré que les PUF et les NPs sont principalement impliquées dans l'augmentation de l'incidence de pathologies respiratoires et cardiovasculaires. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des NPs de NiO sont mal documentés, en particulier sur des cellules vasculaires pulmonaires. Les CE, qui tapissent la lumière des vaisseaux, constituent, après le tractus respiratoire, des cibles privilégiées des NPs, et donc des NPs de NiO (Oberdorster et al., 2005, Horemans et al., 2012, Miller et al., 2017, Nemmar et al., 2002). Des études *in vivo* ont, notamment, montré qu'une exposition aux NPs de NiO déclenchait une toxicité pulmonaire telle qu'une fibrose pulmonaire (Senoh et al., 2017, Mo et al., 2019, Chang et al., 2017b). De plus, des études *in vitro* sur des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, ont montré que les NPs de NiO induisaient un stress oxydant, une inflammation, ainsi qu'une altération de la signalisation calcique, événements également impliqués dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires telles que l'HTA (Guibert et al., 2007, Lai et al., 2015, Capasso et al., 2014, Di

Bucchianico et al., 2018, Latvala et al., 2016). En ce qui concerne la signalisation calcique, il été montré que l'exposition d'artères intra-pulmonaires à des NPs et des PM, modifiait la réactivité vasculaire en induisant une altération de la relaxation endothéliale dépendante du NO, notamment via une perturbation des canaux calciques, tels que les canaux TRPV1 et TRPV4. Ces canaux sont particulièrement exprimés dans les CE et participent au remodelage des vaisseaux pulmonaires dans l'HTP (Ducret et al., 2010, Courtois et al., 2010, Parpaite et al., 2016, Ying et al., 2013). Cependant, bien que la dysfonction endothéliale joue un rôle majeur dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents par lesquels les NPs de NiO induisent un stress oxydant et modifient la signalisation calcique dans les CE pulmonaires humaines n'ont pas encore été rapportés.

Objectifs :

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude sont d'évaluer, *in vitro*, dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC), la toxicité des NPs de NiO en étudiant : (i) la caractérisation physicochimique des NPs, (ii) la cytotoxicité, (iii) l'internalisation des NPs, (iv) le stress oxydant, (v) la réponse pro-inflammatoire, (vi) le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose, (vii) l'altération de la signalisation calcique et (viii) la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO).

NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption

Ophélie Germande^{a,b,c}, Magalie Baudrimont^{a,c} , Fabien Beaufilets^{a,b,d}, Véronique Freund-Michel^{a,b}, Thomas Ducret^{a,b}, Jean-François Quignard^{a,b}, Marie-Hélène Errera^e, Sabrina Lacomme^{a,f}, Etienne Gontier^{a,f}, Stéphane Mornet^g, Megi Bejko^g, Bernard Muller^{a,b}, Roger Marthan^{a,b,d}, Christelle Guibert^b, Juliette Deweidt^{a,b,*} and Isabelle Baudrimont^{a,b,*}

^aUniversité de Bordeaux, Bordeaux, France; ^bInserm U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, Pessac, France; ^cUMR EPOC 5805, Université de Bordeaux, Arcachon, France; ^dService d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Service de Pédiatrie Médicale, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France; ^eDepartment of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA; ^fCNRS, INSERM, BIC, UMS 3420, Université de Bordeaux, Bordeaux, France; ^gCNRS Bordeaux INP, ICMCB, UMR 5026, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

ABSTRACT

In New Caledonia, anthropic activities, such as mining, increase the natural erosion of soils in nickel mines, which in turn, releases nickel oxide nanoparticles (NiONPs) into the atmosphere. Pulmonary vascular endothelial cells represent one of the primary targets for inhaled nanoparticles. The objective of this *in vitro* study was to assess the cytotoxic effects of NiONPs on human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). Special attention will be given to the level of oxidative stress and calcium signaling, which are involved in the physiopathology of cardiovascular diseases. HPAEC were exposed to NiONPs (0.5–150 µg/cm²) for 4 or 24 h. The following different endpoints were studied: (i) ROS production using CM-H₂DCF-DA probe, electron spin resonance, and MitoSOX probe; the SOD activity was also measured (ii) calcium signaling with Fluo4-AM, Rhod-2, and Fluo4-FF probes; (iii) inflammation by IL-6 production and secretion and, (iv) mitochondrial dysfunction and apoptosis with TMRM and MitoTracker probes, and AnnexinV/PI. Our results have evidenced that NiONPs induced oxidative stress in HPAEC. This was demonstrated by an increase in ROS production and a decrease in SOD activity, the two mechanisms seem to trigger a pro-inflammatory response with IL-6 secretion. In addition, NiONPs exposure altered calcium homeostasis inducing an increased cytosolic calcium concentration ([Ca²⁺]_i) that was significantly reduced by the extracellular calcium chelator EGTA and the TRPV4 inhibitor HC-067047. Interestingly, exposure to NiONPs also altered TRPV4 activity. Finally, HPAEC exposure to NiONPs increased intracellular levels of both ROS and calcium ([Ca²⁺]_m) in mitochondria, leading to mitochondrial dysfunction and HPAEC apoptosis.

ARTICLE HISTORY

Received 26 May 2021
Revised 13 January 2022
Accepted 14 January 2022

KEYWORDS

Nickel oxide nanoparticles (NiONPs); pulmonary endothelial cells; reactive oxygen species; calcium signaling; mitochondrial dysfunction

Introduction

New Caledonia is one of the largest nickel producers in the world, producing about 158 000 tons of nickel per year. The mineral resources are concentrated in ultramafic formations covering nearly 30% of the New Caledonian subsoils (Isnard et al. 2016). Ultramafic soils are characterized by a high concentration of trace elements including nickel (Ni), chromium (Cr), cobalt (Co), and manganese (Mn) (Losfeld et al. 2015). Soil erosion releases particles into the atmosphere, such as Ni particles. The

emission of atmospheric particles is amplified by an increased erosion of ultramafic soils, due to anthropic activities, such as mining (He, Yang, and Stoffella 2005; Pasquet et al. 2016) increasing the release of ultrafine particles (UFPs). They are called nanoparticles (NPs) once manufactured. Anthropogenic activities are, in turn, favored by the industry with the current development of nanotechnologies. The hydrometallurgical process contributes to Ni UFPs oxidation that mostly generates nickel oxide in redox state +II (NiO²⁺) (Yokel, Lasley, and Dorman

CONTACT Isabelle Baudrimont  isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr  Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France; Inserm U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, Pessac, France
*Co-last authors.

2006). Thereafter, NiO nanoparticles (NiONPs) can be used in many areas of industry, such as catalysts, energy storage devices, or lithium-ion batteries (especially for electric cars) (Imran Din and Rani 2016).

However, this increased use of NiONPs may contribute to anthropic emission of particles increase and hence increase the risk of particle inhalation by workers and surrounding populations. This leads to a public health concern. Some recent studies revealed significant contamination of the populations of New Caledonia because of soil enrichment by this metal (St-Jean et al. 2018). Moreover, it has been shown that nickel refinery workers had elevated nickel levels in lung tissues (Andersen and Svenes 1989) and that cardiovascular diseases were more prevalent among those workers (Norseth 1994). Thus, it is crucial to evaluate the potentially toxic effects of NiONPs due to the significant increase of anthropic emissions and the variety of their application. In particular, the workers and surrounding populations must have to undergo a risk assessment.

NiONPs are mainly composed of metal elements. They are potentially more harmful than larger-sized particles because of their high surface reactivity, their physical properties, and their large surface area leading to greater interactions with biological systems (Oberdorster, Oberdorster, and Oberdorster 2005). After inhalation, NPs deposition in the lungs is greater than larger-sized particles ($>1 \mu\text{m}$), because NPs are able to accumulate in lung alveoli and in lung parenchyma near the pulmonary arteries (Horemans et al. 2012). Compared to larger-sized particles, NPs can efficiently cross the pulmonary epithelial barrier to reach the pulmonary circulation, where they can be in direct contact with endothelial cells (ECs) that line the inner surface of arteries (Miller et al. 2017). Nemmar et al. (2002), have demonstrated that inhaled NPs can translocate from the lung into the blood. Therefore, NPs likely interact with ECs. ECs play a major role in vascular diseases because they are involved in vascular tone regulation, coagulation control, and vascular barrier integrity (Sandow et al. 2012). Previous *in vivo* studies have evaluated the pulmonary toxicity of NiONPs after intra-tracheal installation in rodents (Wistar rats and mice). NiONPs exposure resulted in pulmonary inflammation characterized by alveolar

proteinosis and a significant increase in neutrophils, eosinophils, macrophages, and lymphocytes and in pulmonary fibrosis (Senoh et al. 2017; Chang et al. 2017; Mo et al. 2019).

Other *in vitro* studies have demonstrated that NiONPs cause oxidative stress and calcium signaling alterations. Both are critical events involved in the physiopathology of cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension (PH) (Guibert, Marthan, and Savineau 2007; Lai, Lu, and Wang 2015). Oxidative stress has been identified as the common mechanism of cellular damage after exposure to NPs (Deweirdt et al. 2020). The number of reactive oxygen species (ROS) generated was higher than exposure to larger particles, likely due to NPs higher surface area (Sioutas, Delfino, and Singh 2005). As regards calcium signaling alterations, previous studies have shown that intrapulmonary arteries exposure to engineered NPs alters vascular reactivity (Courtois et al. 2010; Ying et al. 2013). Calcium homeostasis is controlled by calcium intracellular stores (i.e. endoplasmic reticulum and mitochondria), and calcium influx through membrane channels, such as stretch-activated channels (SAC) (Filippini, D'Amore, and D'Alessio 2019). Therefore, alterations of calcium intracellular stores and/or SAC activity may lead to increased cytoplasmic calcium concentrations. SAC include the mechanosensitive ion channels TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid). TRPV1 and TRPV4 expression are increased in vascular cells, and these channels play a role in pulmonary vessels remodeling, a major PH pathophysiological feature (Ducret et al. 2010; Parpaite et al. 2016). In addition, Goswami et al. have suggested that TRPV4 channels are a potential target for NiNPs and participate in cellular homeostasis alteration by regulating microtubules and actin (Goswami et al. 2010). Interestingly, it has been shown that a 4 h-exposure to NiONPs (1–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increases intracellular calcium concentration in BEAS-2B pulmonary epithelial cells, through an interaction between NiONPs and calcium channels such as TRPV4 (DI Bucchianico et al. 2018).

However, although endothelial dysfunction is known to play a major role in the pathogenesis of vascular diseases such as PH, the underlying cellular and molecular mechanisms by which NiONPs alter calcium signaling in human pulmonary endothelial

cells have not been reported yet. In this respect, the objectives of the proposed *in vitro* study are to assess these NiONPs-dependent mechanisms in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). In this work, we first focused on characterizing the NiONPs used. Then, we investigated NiONPs-induced HPAEC cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, mitochondrial dysfunction, and apoptosis, as well as altered calcium signaling and nitric oxide (NO) bioavailability in these cells.

Materials and methods

Human pulmonary arterial endothelial cells culture

Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) were isolated from the pulmonary artery main branch of 2 donors, a 56-year-old Caucasian male and a 37-year-old Caucasian female (N°433Z034.1 and N°451Z031.14, respectively; PromoCell®, Germany). HPAEC were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) supplemented with Supplement Mix, following manufacturer's guidelines (PromoCell®). Cells were seeded at 20 000 cells/cm² on 25 cm² culture flasks and were maintained at 37 °C, in a 95% humidity air and 5% CO₂. Cell passages were performed after about 80% confluence had been achieved. All experiments have been conducted on HPAEC from passages 2–8.

Reagents and chemicals

HPAEC cells were cultured in ECGM from PromoCell®. The standard physiological salt solution (PSS) was composed of: 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg²⁺ and 2 mM Ca²⁺; adjusted at pH = 7.4. The Krebs-HEPES Buffer (KHB) was composed of 118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 4 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 6 mM D-Glucose. Fluo-4-AM green dye (1 μM), MitoSOX™ red dye (5 μM), Fluo-4FF green dye (10 μM), TMRM red dye (100 nM), 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate (DAF-FM) green dye (5 μM) and Hoechst 33342 blue dye (2 μM) were purchased from ThermoFischer Scientific, Invitrogen™ (France), except Rhod-2, AM red dye (1 μM) which was purchased from Euromedex (France). All of the following chemical reagents

were purchased from Sigma-Aldrich (France) and used as follows: ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), as a chelator of extracellular calcium and diluted in ECGM (final concentration 5 mM); superoxide dismutase–polyethylene glycol (PEG-SOD) and catalase–polyethylene glycol (PEG-CAT), as antioxidant enzymes and diluted in ECGM (300 U/mL and 600 U/mL, respectively); GSK-1016790A, as a TRPV4 channel agonist (100 nM); 2-methyl-1-(3-morpholin-4-ylpropyl)-5-phenyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl] pyrrole-3-carboxamide (HC-067047), as a TRPV4 channel antagonist (1 μM).

NiO nanoparticles

NiONPs characterization

Nickel (II) oxide nanoparticles (NiONPs) (Cat. No.637130) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). These particles partly characterized by the manufacturer have the following physical and chemical characteristics: mean aerodynamic diameter: 50 nm (as assessed by Transmission Electron Microscopy, TEM), density: 6.67 g/ml, purity: 99.8% trace metals basis, refractive index: 1.331 and viscosity: 0.888 cP. NiONPs were suspended in ECGM at a final concentration of 2 mg/ml and stored at 4 °C until use. Before use, stock suspensions were vortexed, sonicated 30 s three times (Vibracell 75186, 130 W, 56–60 Hz), and diluted extemporaneously in ECGM at appropriate concentrations (0.5–150 μg/cm²).

Hydrodynamic size distributions and zeta potential

The hydrodynamic size distribution of NiONPs dispersed in ECGM was assessed at a concentration of 9.5 μg/mL (5 μg/cm²) by Dynamic Light Scattering (DLS), using a VASCO particle size analyzer from Cordouan Technologies® (Pessac, France), as previously described (Deweirdt et al. 2020). The size distribution data were analyzed using a probabilistic self-learning algorithm, so-called Sparse Bayesian Learning (SBL), adapted for highly polydispersed particle suspensions, to improve the resolution of multimodal size distributions. To evaluate NiONPs surface charge, Zeta potential values of NiONPs were measured using laser Doppler electrophoresis and a Wallis zeta potential analyzer from Cordouan Technologies®. NiONPs were dispersed at 0.2 g/L in

1 mM KNO_3 . The pH value of the dispersion was adjusted by adding droplets of 10% HNO_3 or 1 M NaOH solutions. Six measurements were performed for each pH value. Then, in order to check the influence of serum proteins and of other components of the cell growth medium which can be adsorbed on their surface, NiONPs were incubated for 5 min (0.2 mg/ml), then the ECGM was centrifuged and dispersed in 1 mM HEPES adjusted to pH 7.4.

To investigate for all further experiments the mechanism of NiONPs-induced toxic effect in HPAEC, two-time points were performed (4 h or/and 24 h) according to kinetic preliminary studies.

NiONPs internalization

Transmission Electronic Microscope (TEM) was used to study NiONPs internalization. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in Lab-Teck chambers (Dutsher, France), and cultured in supplemented ECGM, for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then exposed or not to NiONPs at 5 µg/cm². After a 4 h-exposure to NiONPs, cells were fixed with 1.6% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.08 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature (RT). After washing in 0.1 M cacodylate buffer, cells were post-fixed in a mix of 1% osmium tetroxide (v/v)/1% potassium ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (p/v) in 0.1 M cacodylate buffer, for 2 h, on ice in the dark. Then, samples were washed in water and stained in 0.5% aqueous uranyl acetate solution for 30 min at RT and in the dark. Subsequently, cells were washed, dehydrated through a series of graded ethanol, and finally embedded, first in a mixture of pure ethanol and epoxy resin 50/50 (v/v) (Epon 812; Delta Microscopie, Toulouse, France) for 2 h and then in 100% resin overnight at RT. The resin polymerization was achieved after 48 h at 60 °C. Samples were then cut using a diamond knife (Diatome, BielBienne, Switzerland) using an ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were laid on copper grids and then stained with Uranyless (Delta Microscopies, Toulouse, France) and lead citrate. Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

Cytotoxic assay

Cell viability was assessed by the determination of cell mitochondrial metabolic activity using the WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) cell proliferation reagent (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations. It is a colorimetric method for determining mitochondrial metabolic activity (viable cells). This assay, in which a succinate-tetrazolium reductase enzyme can convert a tetrazolium salt compound (WST-1) into an aqueous soluble and colored formazan, assumes that the relative number of viable cells is proportional to the mitochondrial enzymatic activity. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h. After a 24 h-exposition with NiONPs (1–150 µg/cm²), cells were rinsed with ECGM and incubated for 3 h with WST-1 reagent. The absorbance was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany). The working concentrations for all further experiments (for which the mortality rate was less than 30%) were all determined with this test.

Oxidative stress

Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in 12-well, 24-well, or 96-well plates and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then exposed to NiONPs (0.25–5 µg/cm²) for 4 or 24 h.

Global reactive oxygen species production

Intracellular ROS production was assessed using the CM-H₂DCFDA probe (Fisher Scientific®), according to the manufacturer's recommendations and adapted from previous studies (Chen et al. 2010). The non-fluorescent CM-H₂DCFDA reagent diffuses rapidly through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to a non-fluorescent oxidative sensitive form (CM-H₂DCF) that is oxidized by ROS to generate a highly fluorescent adduct with a fluorescent intensity proportional to intracellular ROS production. Cells were rinsed with ECGM without serum and were pre-incubated for 20 min with CM-H₂DCFDA probe (final concentration 20 µM) before a 4 h-exposure to NiONPs. Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at 485/520 nm (excitation/emission) by

using the FLUOstar Omega 2.10 plate reader, and the analyses were performed with the MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®). Hydrogen peroxide, H₂O₂, was used as the positive control (1 mM).

Cytoplasmic superoxide anion production

Superoxide anion production was measured using the spin probe 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH, Noxygen®) according to the manufacturer's recommendations and as previously described (Deweirdt et al. 2017). EPR spin trapping is one of the specific techniques used to study free radical production such as the superoxide anion. However, the very short life span and the relatively low concentration of superoxide anion (O₂⁻) made the measurement difficult to develop. The CMH probe has the property of being soluble and makes it possible to measure intracellular O₂⁻ (Dikalov et al. 2011; Konczol et al. 2012). Moreover, the CMH probe can be oxidized by O₂⁻ to generate a stable nitroxide radical (CMH*) easily detectable by EPR spectroscopy. After a 4 h-exposure to NiONPs, cells were incubated for 20 min with the spin-probe mix containing CMH (500 μM), diethyldithiocarbamate (5 μM), and deferoxamine (25 μM) in KHB solution. Then, HPAEC were scraped, homogenized, and frozen in a syringe in liquid nitrogen before EPR analysis. All the EPR spectra were recorded using the Spectrometer X Miniscope MS200 (Magnettech®, Germany). The EPR parameters have been previously described (Deweirdt et al. 2017). Following EPR spectra readings, protein quantities were measured by a Lowry test (Lowry reagent, Sigma Aldrich®), according to the manufacturer's recommendations. The results were normalized to protein quantities and expressed as EPR signal amplitudes in arbitrary units (AU)/mg of protein.

Mitochondrial O₂⁻ production

Production of mitochondrial superoxide anion (O₂⁻_{mt}) was assessed using MitoSOX™ red dye (ThermoFischer®), according to the manufacturer's recommendations by confocal microscopy (TE 2000, Nikon). After a 4 h-exposure to NiONPs, cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark), with a MitoSOX probe in physiological salt solution (PSS). The MitoSOX probe was co-incubated with a

mitochondrial probe (Mitotracker) and a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensity was measured for MitoSOX at 543/605 nm, Mitotracker at 488/515 nm, and Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). For all the confocal microscopy experiments, the plates were observed with an X 200 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope. MitoSOX fluorescence intensity is proportional to the rate of probe oxidation. Analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

Superoxide dismutase enzyme activity

The superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity was measured with a commercially available kit (19160 SOD determination kit, Sigma-Aldrich®, USA). This kit also uses WST-1, which produces a water-soluble formazan dye upon reduction with the superoxide anion. The rate of the reduction with O₂⁻ is linearly related to the xanthine oxidase activity and is inhibited by SOD. The IC₅₀ (50% inhibition of SOD activity) was determined by a colorimetric method. Inhibition of SOD activity can be quantified by measuring the decrease in color development at 440 nm. After a 24 h-exposure to NiONPs, supernatants, and cells were used for analysis according to the manufacturer's recommendations, to determine both intracellular and extracellular SOD activity. The absorbance of supernatants and cells was measured at 440 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany).

Production of nitric oxide (NO) and NO metabolites

Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in 12-well or 96-well plates and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were then exposed to NiONPs (0.5–5 μg/cm²) for 4 or 24 h.

Production of NO

Production of NO was assessed by confocal microscopy using the DAF-FM probe (ThermoFischer®), according to the manufacturer's recommendations. After a 4 h or 24 h exposure with NiONPs, cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark), with a

DAF-FM probe in PSS, and co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensities were measured at 488/515 nm (excitation/emission) for the DAF-FM and at 408/450 nm for the Hoechst 33342. The DAF-FM fluorescence intensity is proportional to the rate of probe oxidation. The analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

Production of NO metabolites

Nitrite and nitrate products were assessed in HPAEC supernatants by using the Griess reagent (Sigma-Aldrich®), according to the manufacturer's recommendations. After a 24 h-exposure to NiONPs, the supernatants were removed, collected, and centrifuged at 10 000 *g* for 10 min at 4 °C. The supernatants were then analyzed according to the manufacturer's guidelines and the absorbance was measured at 540 nm by spectrophotometry, using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany). *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-Name) was used as a negative control (final concentration 10⁻⁴ M) and Sodium nitroprusside (SNP) was used as a positive control (final concentration 10⁻⁴ M).

Endothelin-1 production

Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed with the culture medium and exposed to NiONPs (0.5–5 μg/cm²) for 24 h. Supernatants were then collected, centrifuged at 10 000 *g* for 10 min at 4 °C, and analyzed using Endothelin-1 kit (Endothelin-1 ELISA kit, Enzo Life Sciences®, France), according to the manufacturer's guidelines. The absorbance was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano 2.10, BMG Labtech®, Germany).

Pro-inflammatory effects: expression and secretion of interleukin (IL)-6

Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed with the culture medium and

exposed to NiONPs (0.5–5 μg/cm²) for 24 h. Supernatants were then collected, centrifuged at 10 000 *g* for 10 min at 4 °C, and analyzed using an ELISA kit (Human IL-6 DuoSet® ELISA R&D Systems, USA), according to the manufacturer's guidelines. The absorbance was measured at 450 nm and corrected at 570 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano 2.10, BMG Labtech®, Germany).

Cytoplasmic, endoplasmic reticulum, and mitochondrial calcium measurements

Variations in intracellular calcium [Ca²⁺]_i, endoplasmic reticulum (ER) calcium [Ca²⁺]_{ER} and mitochondrial calcium [Ca²⁺]_m were detected respectively using the Fluo-4-AM green dye, the Fluo-4FF AM green dye and the Rhod-2 AM red dye, according to the manufacturer's guidelines. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposure with NiONPs (0.5–5 μg/cm²), cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark), with the different fluorescent probes in PSS. Some cells were pretreated for 1 h with HC-067047 (1 μM) (which was then also left during exposure to NiONPs). Some cells were also incubated with EGTA (5 mM) during the experiments. An increase in [Ca²⁺]_i after cell treatment with the TRPV4 agonist GSK-1016790A (10 nM) was also evaluated. The Fluo-4-AM probe, Rhod-2, AM probe, and Fluo-4FF, AM probe were co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The plates were observed at X 200 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). The fluorescence intensity was measured for Rhod-2 at 543/605 nm, for Fluo-4-AM and Fluo-4FF at 488/515 nm and for Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). For each experiment 20 to 30 cells were analyzed per well. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

Mitochondrial activity

Mitochondrial membrane potential measurement

The mitochondrial membrane potential (Ψ_{MP}) was measured by confocal microscopy using TMRM red dye (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester,

Perchlorate, ThermoFischer) according to the manufacturer's guidelines. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²), cells were incubated for 20 min (37 °C, in the dark) with a TMRM fluorescent probe in PSS. The TMRM probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The fluorescence intensity was then measured at 543/605 nm (excitation/emission). The analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

Mitochondrial mass

The mitochondrial mass was measured using confocal microscopy using the Mitotracker green dye (ThermoFischer) according to the manufacturer's guidelines. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²),

Canto flow cytometer (Bioscience[®], France) to detect life, apoptotic, and necrotic cells.

Gene expression

A polymerase chain reaction (PCR) was performed to evaluate IL-6, TRPV4, and bcl-2 mRNA expressions. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed with the culture medium and exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 24 h. After a 24 h-exposure, mRNA extraction and purification were performed using a commercially available kit (SV Total RNA Isolation System, Promega), according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was carried out by M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase kit (Promega). Finally, a real-time quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using a LightCycler[®] 480 (Roche) with a first cycle at 95 °C for 2 min, fol-

Primers	Sense	Antisense
IL-6	5'-ACAGCCACTCACCTCTTCAG-3'	5'-TGGAAGCATCCATCTTTTC-3'
TRPV4	5'-CGCAAGTGGAGGACTGATGA-3'	5'-TAGAAATGAGTGGCAGAGAAGCT-3'
Bcl-2	5'-GGCCTTCTTTGAGTTCGGTG-3'	5'-CATCCAGCCTCCGTTATCCTG-3'
RPL13	5'-GGGAGCAAGGAAAGGTCTTA-3'	5'-CACCTGCAAATTCTCCGAGT-3'
GAPDH	5'-CACATGGCCTCCAAGGAGTAA-3'	5'-TGAGGGTCTCTCTCTCTTGT-3'
Gusb	5'-TGAAATCGCAAAATTCAAAT-3'	5'-CCATCTGGGTCTGGATCAAAA-3'

cm²), cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark) with the MitoTracker probe in PSS. The Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (cccp) was used as a positive control (final concentration 5 µM). The MitoTracker probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The fluorescence intensity was measured at 408/450 nm (excitation/emission). The analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

Apoptosis induction

The Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) kit (ThermoFischer) was used according to the manufacturer's guidelines for the detection of apoptosis and necrosis. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After a 24 h-exposure to NiONPs (0.5–10 µg/cm²), supernatants and cells were analyzed for 1 h by flow cytometry using a BD FACS

lowed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 1 min. The ribosomal protein (RPL13), the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the β-glucuronidase (Gusb) genes were used as internal controls. The following primer sequences were used:

Statistical analysis

Each experimental condition was independently repeated several times (n indicates the number of experiments) and for each independent experiment, 3–8 wells per condition were assessed. Data are expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM) for n independent experiments. Statistical analyses have been performed using either one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons when $n > 30$, or Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post-test when $n < 30$. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$) All data were analyzed using Graphpad PRISM software

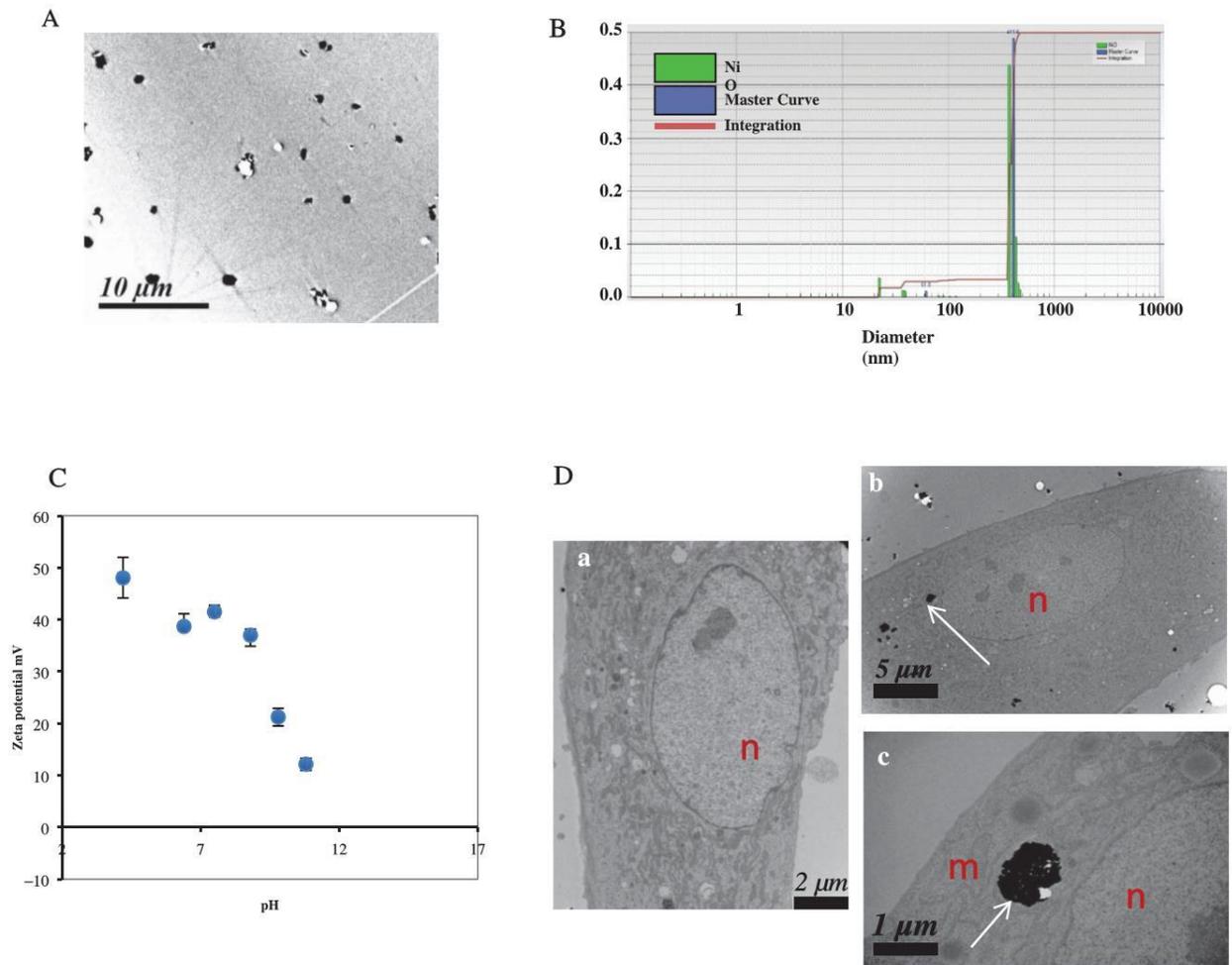


Figure 1. Characteristics of NiONPs in ECGM. (A) NiONPs in ECGM observed by transmission electronic microscope (TEM). (B) Size distribution of NiONPs ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) measured by DLS. (C) Zeta potential of NiONPs (Da) HPAEC observed by TEM, control (X12000). (Db) NiONPs ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) internalization and intracellular localization in HPAEC (X15000). White arrows show intracellular NiONPs aggregate, 'n' corresponds to the nucleus, 'm' corresponds to the mitochondria. Statistically significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) as compared to untreated control cells.

(v6, Graphpad Software). p -Values < 0.05 were considered significant.

Results

Characterization of NiONPs

Dynamic light scattering measurement (DLS) was implemented to assess the colloidal stability state of NiONPs in the culture medium. The results at $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ showed a peak detected around 400 ± 20 nm, indicating a flocculation state of NiONPs of 50 nm unit size (Figure 1(A,B)). In Figure 1(C), we observe that NiONPs display positive zeta potential values from pH 4 to 11 with a decrease in alkaline media. These results are in accordance with

the literature showing zero point of charge around pH 11 (Zheng et al. 2017). For the physiological pH value (i.e. 7.4) NiONPs are positively charged with a quite high potential value of around +40 mV. The value of the zeta potential after incubation in ECGM is radically modified, becomes negative (-26.26). Serum proteins present in the culture medium are mostly negatively charged with $\text{pI} < 7.4$. This change of zeta potential after incubation may be due to a protein corona formation, mainly driven by electrostatic interaction at NiONPs surface (among other types of interactions that may occur). After a second washing with 1 mM HEPES buffer at pH 7.4, the absolute potential value slightly increased further (-36.69), which may be explained by a screening of counter ions that are displaced

during the second washing. This result also suggests that some of these proteins are strongly adsorbed on NiONPs.

Internalization of NiONPs in HPAEC

TEM was performed to observe NiONPs uptake and localization in HPAEC after a 4 h-exposure ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Control cells are shown in Figure 1(Da). After a rapid internalization, NiONPs were mainly clustered in vesicles in the cytoplasm (Figure 1(Db)). Internalized NiONPs were mostly organized in aggregates of various sizes. NiONPs were also localized near the nucleus or near mitochondria (Figure 1(Dc)).

NiONPs decrease cell viability

To understand the mechanism of NiONPs-induced effect in HPAEC, the nontoxic range of NiONPs concentration (mortality rate < 30%) was first investigated by using the WST-1 test. Cytotoxic effect was evaluated on HPAEC after a 24 h-treatment with NiONPs. The results showed a significant and concentration-dependent decrease of cell viability starting from $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (78.25% of viability, $*p < 0.05$) as compared to untreated cells (Figure 2(A)). These results also showed that HPAEC mitochondrial activity decreased in a concentration-dependent manner upon exposure to NiONPs.

NiONPs induce oxidative stress

To investigate the oxidative stress, different assays were performed, to measure global ROS production, cytoplasmic superoxide anion (O_2^-) production, and mitochondrial O_2^- production. In addition, the antioxidant response has been evaluated by measuring SOD enzymatic activity.

Cytoplasmic ROS production

After a 4 h-exposure of HPAEC to NiONPs (0.25 – $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant and concentration-dependent increase in intracellular global ROS production (13.28%; 14.08%; 14.04% and 15.57% respectively for 0.5, 2.5, 1, and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (Figure 2(B)).

Cytoplasmic O_2^- production

After a 4 h-exposure to NiONPs (0.5 – $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant and concentration-dependent increase in intracellular O_2^- production (5854.29 AU/(mg/ml) of protein and 5881.67 AU/(mg/ml) of proteins, respectively for 2.5 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (Figure 2(C)).

Mitochondrial O_2^- production

After a 4 h-exposure of HPAEC to NiONPs (0.5 – $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant concentration-dependent increase in mitochondrial O_2^- production (143.36% and 170.17% respectively for 2.5 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as compared to untreated cells (Figure 2(D)).

SOD activity

After a 24 h-exposure of HPAEC to NiONPs (0.5 – $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant decrease in SOD enzymatic activity was observed at the two highest concentrations tested (2.5 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ with 58.13% and 59.56% respectively), compared to the untreated cells (Figure 2(E)).

NiONPs increase IL-6 expression and secretion

IL-6 mRNA expression and IL-6 secretion were measured in HPAEC by qPCR and ELISA assays, respectively. After a 24 h-exposure to NiONPs (0.5 – $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), the results showed a significant increase in both IL-6 mRNA expression and IL-6 secretion at $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (80.30 pg/mg of proteins) as compared to untreated cells (Figure 3(A,B)). In order to determine whether the inflammatory response induced by NiONPs involved oxidative stress, the same experiments were performed using antioxidant enzymes. After a 1-h pretreatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-CAT, followed by a 24 h-exposure to NiONPs ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), no significant effect on IL-6 secretion was observed anymore, as compared to untreated cells (Figure 3(C)). These results, therefore, show that ROS production contributes to the pro-inflammatory response observed in HPAEC after exposure to NiONPs ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

NiONPs increase the cytosolic calcium level

The basal cytoplasmic calcium concentration was measured in HPAEC. After a 4 h and a 24 h-exposure

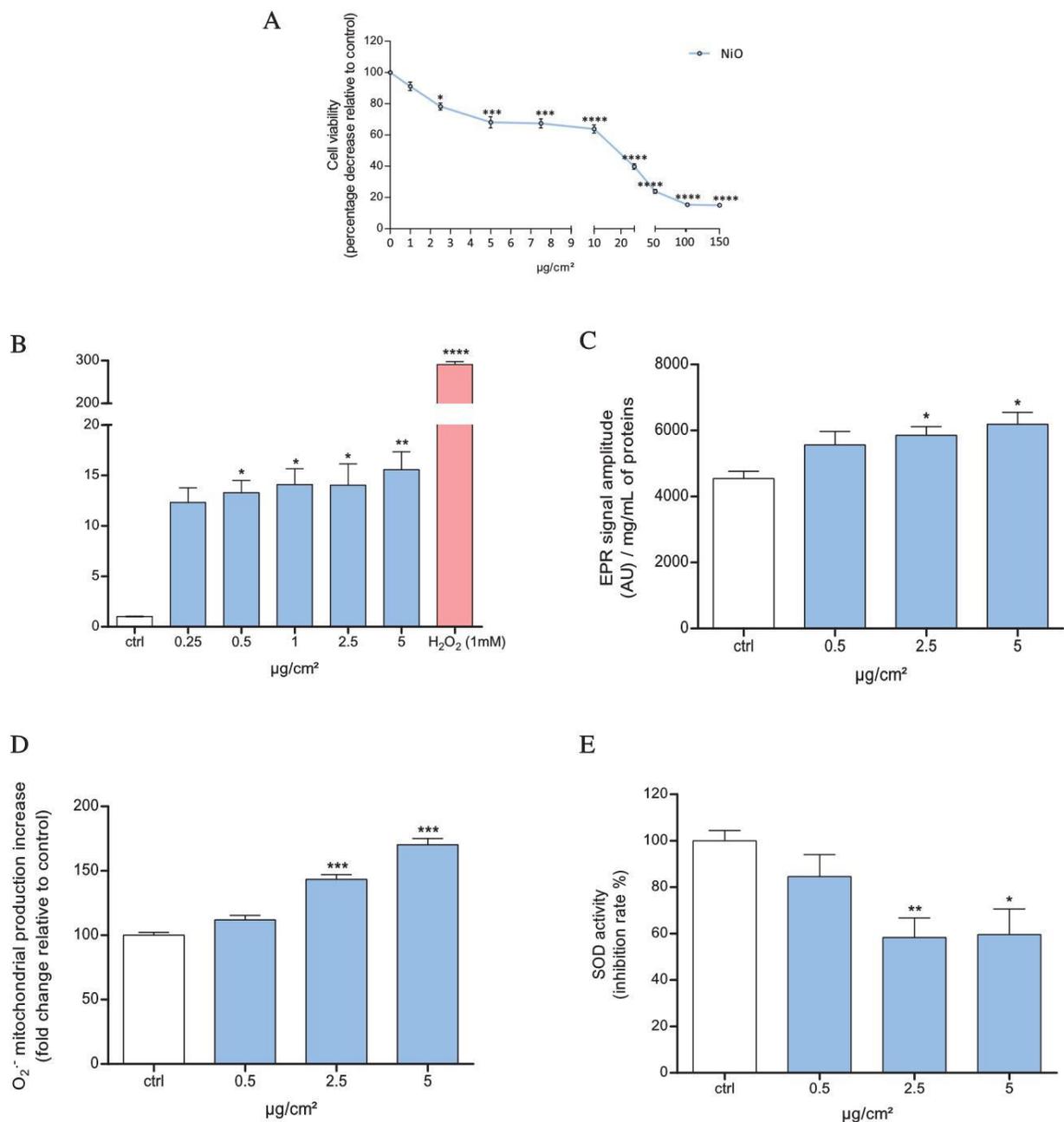


Figure 2. Viability cells and Oxidative stress on HPAEC after NiONPs exposure. (A) Cell viability was measured after a 24 h-exposure with NiONPs (1–150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) by the colorimetric WST-1 assay. Results are expressed as the percentage of cell viability in treated cells, as compared to control cells (100%). Data were mean \pm SEM of four independent experiments, $n=4$ (eight wells/concentration). (B) Global intracellular ROS production after 4 h-exposure with NiONPs was measured by spectrofluorimetry via CM-H₂DCFDA probe assay. (C) Intracellular O₂⁻ production after 4 h-exposure with NiONPs, measured by EPR spectrometer with CMH probe. Results are expressed in EPR signal amplitude in arbitrary units (AU)/mg/mL of proteins. (D) Mitochondrial O₂⁻ production after 4 h-exposure with NiONPs, measured with MitoSOX probe (5 μM), by confocal microscopy. The values were normalized to untreated cells, and results are expressed as the fold change of MitoSOX probe fluorescence intensity, relative to control cells. (E) SOD activity was measured by a colorimetric test after 24 h-exposure with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the SOD activity inhibition rate relative to the control cells. Data were mean \pm SEM of three independent experiments, $n=3$ (three wells/concentration). Statistically significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) as compared to untreated control cells.

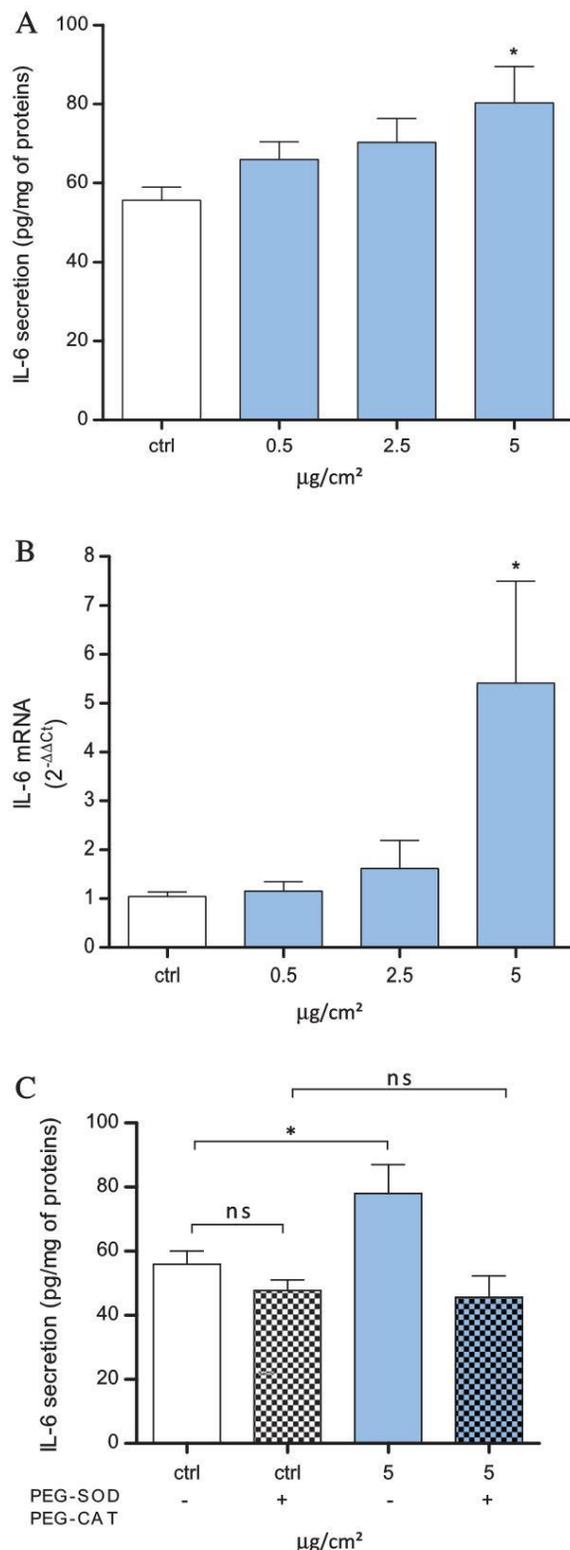


Figure 3. IL-6 secretion and expression in HPAEC after 24h-exposure with NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$). (A) Secretion of IL-6 measured by ELISA assay. The results were expressed as pg/mg of proteins. Data were mean \pm SEM of six independent experiments, $n=6$ (three wells/concentration). (B) IL-6 mRNA expression measured by RT-qPCR. The results were expressed as the fold change of IL-6 mRNA expression relative to the

Figure 3. (Continued)

control cells. Data were mean \pm SEM of five independent experiments ($n=5$) (three wells/concentration). (C) Effect of antioxidant enzymes after or not 1h-pretreatment with PEG-SOD ($600\ \text{U}/\text{mL}$) and PEG-catalase ($300\ \text{U}/\text{mL}$) measured by ELISA. Data were mean \pm SEM of three independent experiments ($n=3$) (three wells/concentration). Results were expressed as pg/mg of proteins in the supernatant. Statistically significant at $p < 0.05$ (*) as compared to untreated control cells.

to NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) calcium imaging was assessed with Fluo-4-AM probe, and the results showed that in HPAEC, after a 4h-exposure, a significant concentration-dependent increase of the basal cytoplasmic calcium levels was observed (121.17%, 128.1%, and 156.19%, respectively for 0.5, 2.5, and $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as compared to untreated cells (Figure 4(A)). Interestingly, after a 24h-exposure to NiONPs, this significant increase of cytoplasmic calcium levels was still observed (120.34% and 129.74% for 2.5 and $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively), as compared to untreated cells (Figure 4(B)), suggesting that this alteration of calcium homeostasis was maintained throughout the exposure duration for 2.5 and $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Oxidative stress leads to increased cytoplasmic calcium levels

In the second set of experiments, in order to determine whether the NiONPs-induced alterations in intracellular calcium levels were correlated to oxidative stress, the same experiments were performed using antioxidant enzymes. With a 1-h pretreatment with PEG-SOD and PEG-CAT, prior to a 4h-exposure to NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant concentration-dependent increase in cytoplasmic calcium levels was still observed (110.04% and 114.68% for 2.5 and $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively) as compared to untreated cells (Figure 4(C)). However, pretreatment with antioxidant enzymes significantly inhibited the increase in cytoplasmic calcium levels for $0.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, as compared to NiONPs-treated cells without antioxidant enzymes. Therefore, the results suggest that ROS production is only partially involved in the alterations of calcium levels. Thus, additional experiments were performed in order to elucidate another potential mechanism involved in NiONPs-induced calcium signaling alterations.

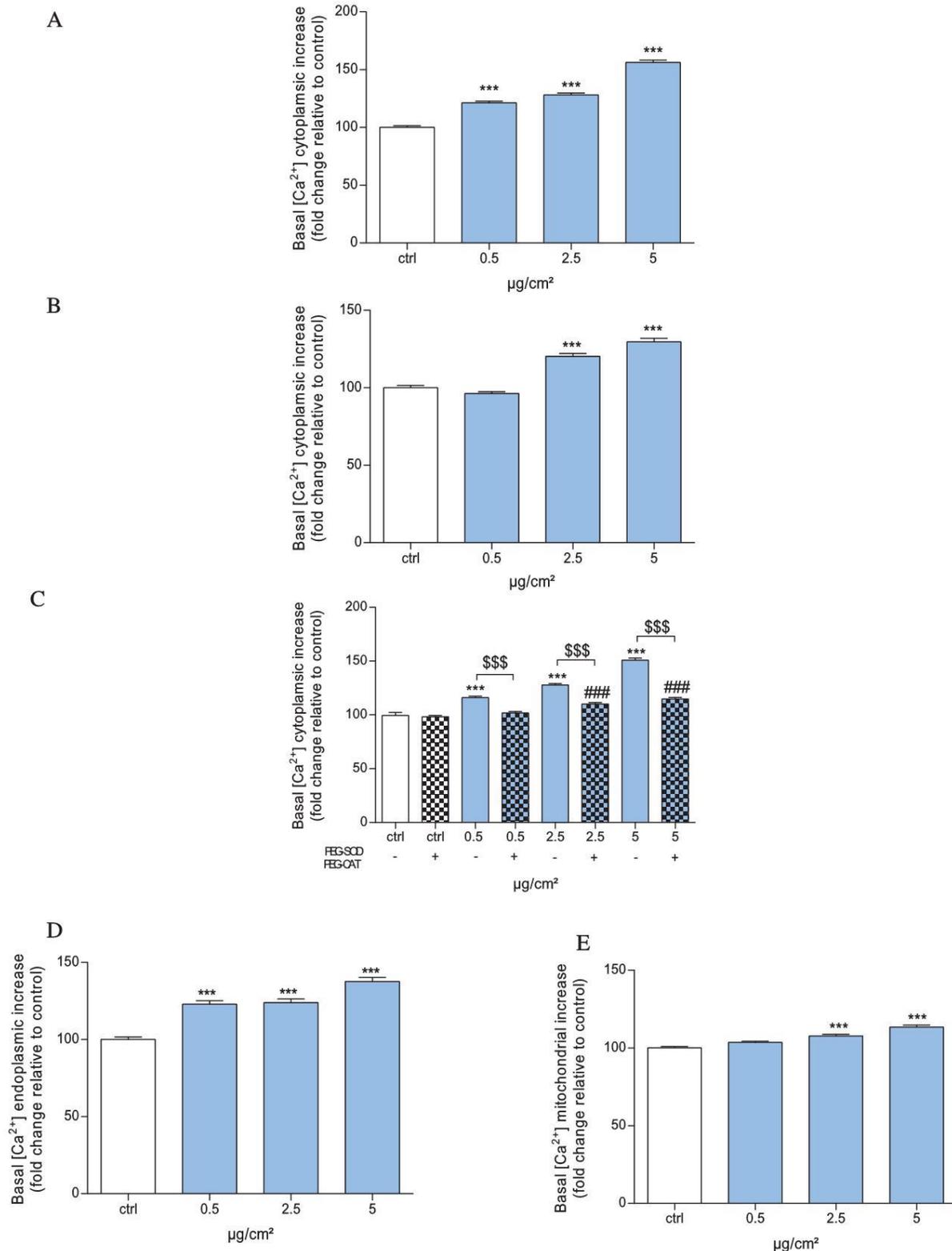


Figure 4. Calcium level in HPAEC with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Cytoplasmic ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), endoplasmic reticulum ($[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$) and mitochondrial calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) levels was measured by confocal microscopy respectively with Fluo-4, AM probe (1 μM), Fluo-4FF, AM probe (10 μM) and Rhod-2AM probe (1 μM). (A) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cells after 4 h-exposure with NiONPs. (B) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cells after 24 h-exposure. (C) Effect of antioxidant enzymes after or not 1 h-pretreatment with PEG-SOD (600 U/mL) and PEG-catalase (300 U/mL) and 4 h-exposure with NiONPs. (D) $[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$ in cells after 4 h-exposure with NiONPs. (E) $[\text{Ca}^{2+}]_m$ in cells after 4 h-exposure with NiONPs. All values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the probes fluorescence intensity relative to the control cells (100%). Data are mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$), (six wells/concentration). Statistically significant at $p < 0.001$ (***) , as compared to untreated cells, statistically significant at $p < 0.001$ (\$\$\$), as compared to cells pretreated with antioxidant enzymes.

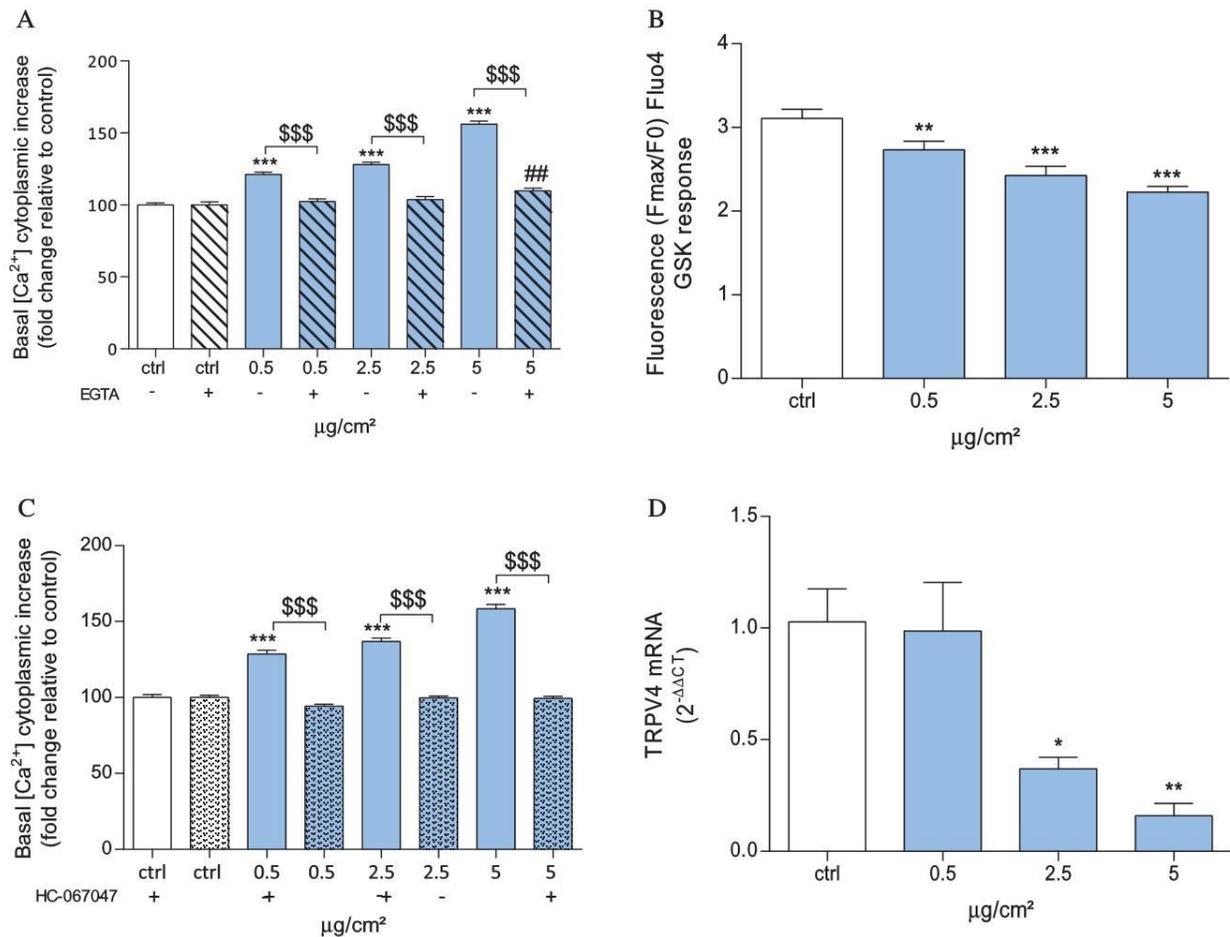


Figure 5. Effect of extracellular calcium and TRPV4 channel on $[Ca^{2+}]_i$ level rise after NiONPs exposition (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). $[Ca^{2+}]_i$ was measured with Fluo-4, AM probe (1 μM), by confocal microscopy. (A) Effect of extracellular calcium on $[Ca^{2+}]_i$ level rise after 4 h-exposure with NiONPs in the presence (1.6 mM $[Ca^{2+}]_e$) or in absence of extracellular calcium (0 mM $[Ca^{2+}]_e$). (B) Effect of TRPV4 agonist after 4 h-exposure with NiONPs: The GSK response (100 nM) was expressed as the Fluo-4 fluorescence ratio (Fmax/F0). (C) Effect of TRPV4 antagonist after 4 h-exposure with NiONPs and after or not 1 h-pretreatment with HC-067047 (1 μM). Data were mean \pm SEM of three independent experiments, ($n=3$) (five wells/concentration). (D) TRPV4 mRNA expression after 24 h-exposure with NiONPs, measured by RT-qPCR. The results were expressed as the fold change of TRPV4 mRNA expression relative to the control cells. Data were mean \pm SEM of four independent experiments, ($n=4$) (three wells/concentration). Statistically significant at $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***) as compared to untreated cells statistically significant at $p < 0.001$ (\$\$\$), as compared to both condition (HC pretreatment or not).

NiONPs alter calcium channels

To assess the role of extracellular sources in cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ rise, HPAEC were exposed to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in the presence or in the absence of extracellular calcium, by use of the extracellular calcium chelator (EGTA). In the presence of EGTA, the result showed a significant increase in cytoplasmic calcium levels, but only at the highest concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (109.71%) as compared to untreated cells (Figure 5(A)). This observation suggests that for lower concentrations, NiONPs-induced increase in cytoplasmic calcium levels only involves extracellular calcium, whereas at

the highest concentration, NiONPs-induced cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ rise may involve both extracellular and intracellular calcium stores. Then, the activity of the mechanoreceptor transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channels was assessed. TRPV4 involvement was studied by calcium imaging using a TRPV4 activator (GSK1016790A) and a TRPV4 antagonist (HC-067047). The results in HPAEC after a 4 h-exposure to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) showed a significant concentration-dependent decrease in the GSK1016790A response by 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, as compared to untreated cells (Figure 5(B)). By contrast, no significant effect of HC-067047 on NiONPs in basal

calcium cytoplasmic level was observed, as compared to control cells (Figure 5(C)). The analysis of TRPV4 mRNA expression after a 24 h-exposure to NiONPs showed a significant decreased TRPV4 expression ($0.37 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $0.16 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ respectively for 2.5 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) compared to untreated cells ($1.02 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Figure 5(D)). All these results, therefore, suggest that the increase in cytoplasmic calcium levels induced by NiONPs may be related to altered TRPV4 channel activity.

NiONPs impair intracellular calcium stores

To investigate if a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise could also be mediated by intracellular Ca^{2+} stores, particularly by ER and mitochondria, intracellular calcium content was studied. In HPAEC after a 4 h-exposure to NiONPs ($0.5\text{--}5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant concentration-dependent increase in ER calcium levels and in mitochondria calcium levels was observed, respectively for $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and for $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, as compared to untreated cells (Figure 4(D,E)). These results, therefore, suggest that NiONPs can increase calcium levels in both organelles, further suggesting that these organelles may pump calcium from the cytoplasm.

NiONPs induce mitochondria alterations

Our results showed that NiONPs impair mitochondria with an increase in mitochondrial O_2^- production for $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and with an increase in calcium mitochondrial levels (Figures 2(C) and 4(E)). The membrane mitochondrial potential (ΨMP) was then studied using the TMRM probe with confocal microscopy. As compared to controls, after a 4 h-exposure to NiONPs, both the ΨMP (89.98%) (Figure 6(A)) and the mitochondrial mass decreased significantly for $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (85.59%) (Figure 6(B)) as compared to untreated cells. In Figure 6(C), after HPAEC exposition to NiONPs, mitochondria seemed fragmented (white arrow), as compared to control cells.

NiONPs increase apoptosis in HPAEC

After a 24 h-exposure to NiONPs ($0.5\text{--}10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant and concentration-dependent increase in the number of apoptotic HPAEC was detected (29.32% and 38.34% respectively for 7.5 and $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), as compared to untreated cells (Figure 7(A)).

This increased HPAEC apoptosis was then confirmed by the significant decrease in bcl-2 mRNA expression, as assessed by RT-qPCR ($0.36 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$), after a 24 h-exposure to NiONPs compared to control cells ($1.05 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Figure 7(B)).

NiONPs impair NO production and increase the production of nitrites and nitrates

The production of NO was measured using the DAF-FM probe with confocal microscopy, and the Griess reaction was used to determine reactive nitrosamine species such as peroxynitrites (ONOO^-). After a 4 h-exposure of HPAEC to NiONPs ($0.5\text{--}5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant increase in NO production was observed (111.15%, 111.16%, and 109.83%, respectively for 0.5, 2.5, and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (Figure 7(C)). Interestingly, after a 24 h-exposure to NiONPs ($0.5\text{--}5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant dose-dependent decrease of NO production was observed (78.49% and 68.60% respectively for 2.5 and $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (Figure 7(D)). We have previously shown that after a 4 h-exposure, NiONPs are able to increase intracellular production of O_2^- ($2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) in HPAEC. Since NO can be oxidized by O_2^- to form NO metabolites such as ONOO^- , the production of nitrites and nitrates were then investigated in HPAEC. Our results showed that after a 24 h-exposure to NiONPs ($0.5\text{--}5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant increase of NO metabolites production was observed for $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0.77 ng/ μL), as compared to untreated cells (0.62 ng/ μL) (Figure 7(E)).

NiONPs increase endothelin-1 production

The production of ET-1, was measured by ELISA assay. After a 24 h-exposure of HPAEC to NiONPs ($0.5\text{--}5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant increase of ET-1 production was observed at the highest concentration of $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (110.14 pg/mL of proteins) as compared to untreated cells (65.03 pg/mL of proteins) (Figure 7(F)). That result suggests that NiONPs may induce alterations in vascular reactivity.

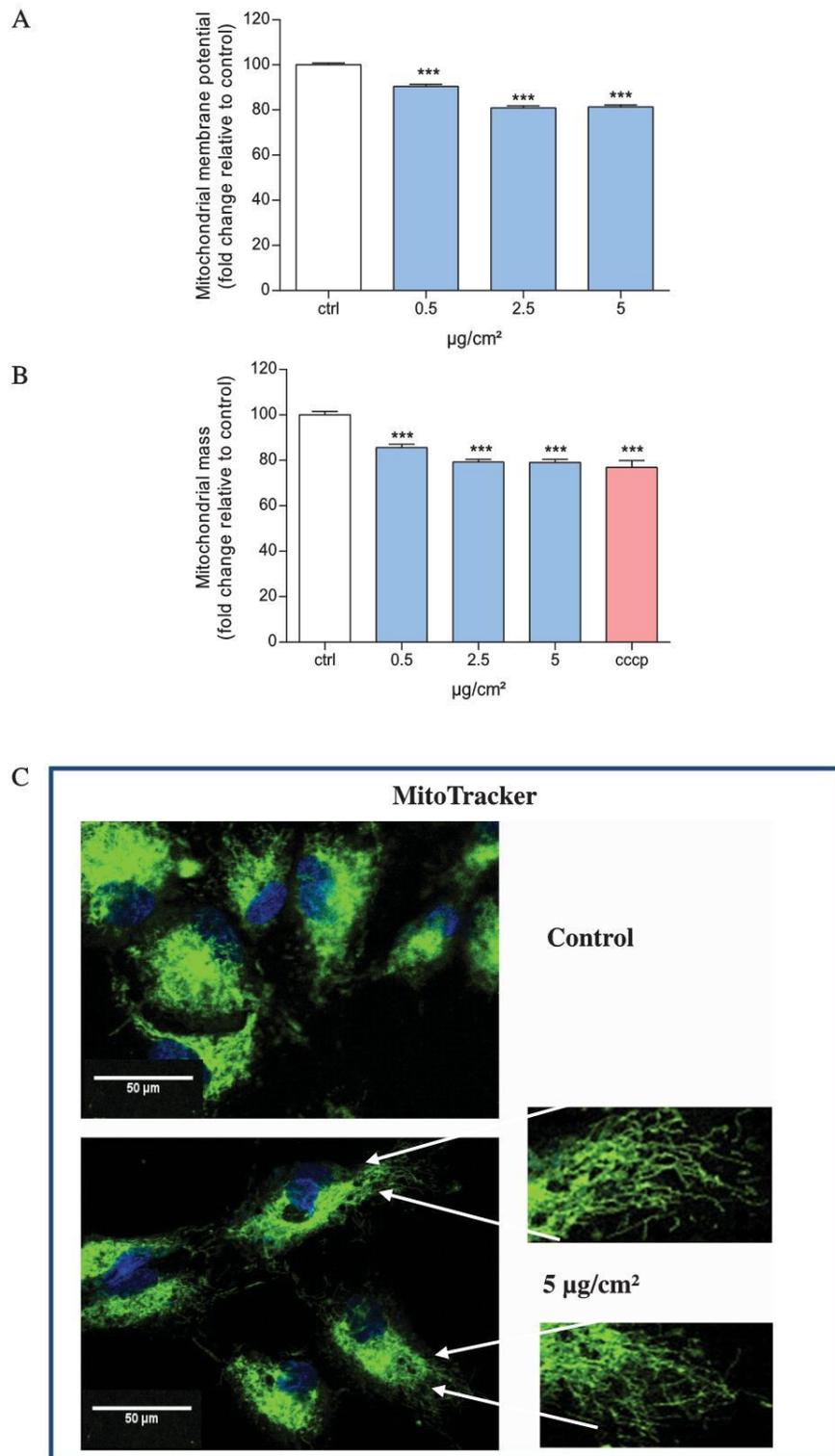


Figure 6. Mitochondria alteration after 4 h-exposure with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (A) Mitochondrial potential membrane (ΨMP) measured by confocal microscopy with TMRM probe (100 nM). (B) The mitochondrial mass measured by confocal microscopy with Mitotracker probe (1 μM). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the TMRM or Mitotracker probes fluorescence intensity relative to the control cells (100%). Data were mean \pm SEM of three independent experiments, ($n=3$) (six wells/concentration). Statistically significant at $p < 0.001$ (***) as compared to untreated control cells.

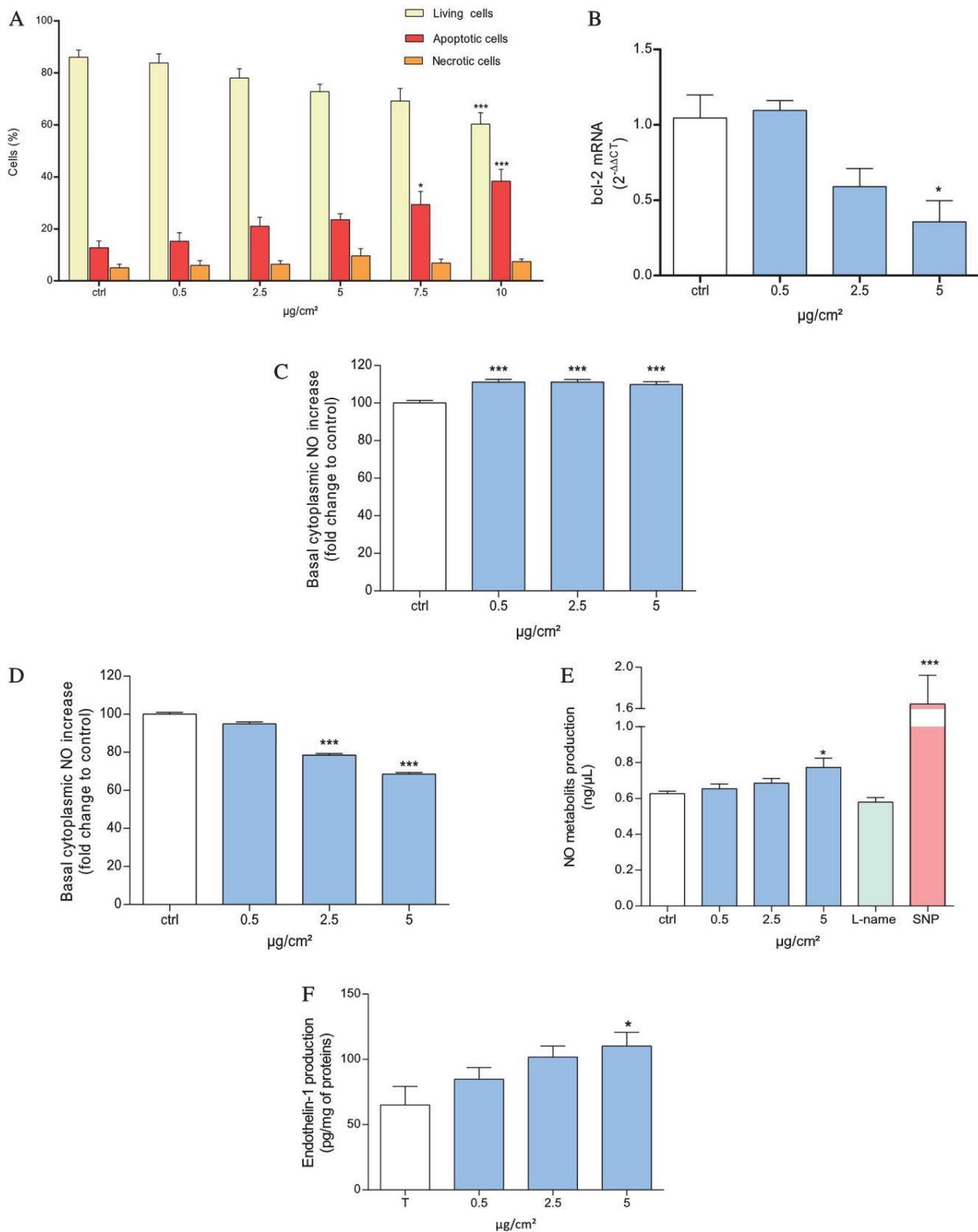


Figure 7. (A) Apoptotic and necrotic cells measured by Annexin V/PI assay after 24 h-exposure with NiONPs (0.5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results were expressed as percentage relative to control cells. Data are Mean \pm SEM of four independent experiments ($n = 4$), (eight wells/concentration). (B) bcl-2 mRNA expression in HPAEC after 24 h-exposure with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), measured by RT-qPCR. The results were expressed as the fold change of bcl-2 mRNA expression relative to the control cells. NO level was measured by confocal microscopy with DAF-FM probe (5 μM). (C) NO production after 4 h-exposure with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (D) NO production after 24 h-exposure with NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The values were normalized to untreated cells, and results are

Figure 7. (Continued)

expressed as the fold change of DAF-FM probe fluorescence intensity relative to control cells. (E) NO_2^- and NO_3^- production measured by the Griess reaction after 24 h-exposure with NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$). The results were expressed in $\text{ng}/\mu\text{L}$. Data were mean \pm SEM of four independent experiments, ($n = 4$) (three wells/concentration). (F) ET-1 production in HPAEC after 24 h-exposure with NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Production of ET-1 measured by ELISA assay. The results were expressed as pg/mg of proteins. Data were mean \pm SEM of five independent experiments, $n = 5$ (three wells/concentration). Statistically significant at $p < 0.05$ (*) as compared to untreated control cells. Statistically significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****), as compared to untreated control cells.

Discussion

Occupational exposure in manufacturing and nickel laterite mines exploitations in New Caledonia could be a concern not only for workers handling NiONPs, but also for the surrounding population [ATSDR, 2005]. It is well-known that calcium has a key role in endothelial regulation and that alterations of calcium homeostasis can play a pathophysiological role in vascular diseases (Berridge, Bootman, and Roderick 2003). However, although only a few studies have investigated the direct effects of NiONPs on bronchial (BEAS-2B) and alveolar (A549) epithelial cells, their effects on pulmonary arterial endothelial cells remain unknown. Indeed, *in vitro* studies using human bronchial and alveolar epithelial cells have demonstrated the cytotoxicity of NiONPs, leading to a decrease in cell viability after exposure to $0.1\text{--}40\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Moreover, the same studies have shown that NiONPs ($0.5\text{--}100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) generate oxidative stress, with an increase in the global ROS production and a decreased activity of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and glutathione (GSH) (Ahamed 2011; Mohamed et al. 2018; Duan et al. 2015; Latvala et al. 2016). Additionally, exposure to NiONPs ($20\text{--}100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) leads to an increased secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-8 in both types of epithelial cells (Capasso, Camatini, and Gualtieri 2014). The underlying cellular and molecular mechanisms remain unclear, in particular on calcium signaling and mitochondrial dysfunction.

Our results showed that polydispersed NiONPs suspension in the culture medium contained three types of population: (1) very large aggregates, (2) small aggregates, and (3) a large number of isolated particles (90% of the population) (Figure 1(B)). In acellular conditions, NiONPs were able to induce the generation of ROS in the culture medium (data not shown), probably due to their high surface reactivity. When HPAEC were exposed to NiONPs,

these particles were rapidly internalized in the cytoplasm into vesicles to form aggregates of different sizes. Despite the fact that NiONPs were not seen in mitochondria, some aggregates were detected very close to them, suggesting that they may be able to interfere with mitochondrial functions (Figure 1). Like other metallic NPs, NiONPs internalization appears to be a key factor in their toxicity (Munoz and Costa 2012). The cytotoxic effect of NiONPs on HPAEC was evaluated to select the concentrations (mortality rate $< 30\%$) to be used for further mechanistic experiments. Taking into account the respiratory rate for a healthy man ($20\ \text{L}/\text{min}$., 12-h/day exposure), the alveolar deposits ($20\text{--}50\%$), the alveolar surface ($75\ \text{m}^2$), and the possible internalization of the nanoparticles in endothelial cells, the different NiONPs concentrations used in this study ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) would reflect an atmospheric exposure of approximately $50\ \text{ng}/\text{m}^3$. These later NiONPs concentrations are realistic concentrations close to the ones found from particles exposure in New Caledonia near nickel laterite mines [Scal'AIR, 2018] (Akerlund et al. 2019). It was shown that one of the key mechanisms leading to metal oxide NPs cytotoxicity is an overproduction of ROS (Ivask et al. 2015). Our results demonstrate that NiONPs increased the global production of ROS in HPAEC along with a large increase in cytoplasmic O_2^- (Figure 2(B–D)). Transition metals, such as nickel, are known to produce reactive free radicals, such as O_2^- , via the Fenton reaction (Abdal Dayem et al. 2017). Previous studies carried out on A549 cells have shown a significant increase in ROS production after a 24 h-exposure to NiONPs (Mohamed et al. 2018). Our present study suggests that HPAEC may be more sensitive to NiONPs than epithelial cells, being able to produce ROS after a 4 h-exposure to NiONPs, only.

Once ROS are produced, the antioxidant system increases the production of antioxidant enzymes in

order to maintain the redox balance (Sies, Berndt, and Jones 2017). Thus, we assessed the effect of NiONPs exposure on the antioxidant response in HPAEC and our results showed a decrease in SOD activity (Figure 2(E)). Several authors have demonstrated that other NPs (i.e. silicon nanoparticles, carbon nanotubes) also decrease antioxidant enzyme activity in other types of endothelial cells, such as in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Cao et al. 2017). These enzymes undergo functional changes by direct interactions with NPs (Zhang et al. 2019). A decrease in the antioxidant activity might explain the NiONPs-induced oxidative stress in HPAEC. It has been demonstrated, both *in vivo* and *in vitro*, that many metallic oxide NPs generate ROS. An enhanced ROS generation might activate the inflammatory pathways via the secretion of pro-inflammatory cytokines (Zhang et al. 2012). Our results are in accordance with that previous study. We showed that NiONPs can induce a pro-inflammatory response, characterized by both increased IL-6 expression and secretion (Figure 3). Similar results have already been observed in HPAEC after exposure to Ultrafine Particles (<100 nm) (Karoly et al. 2007). We also showed that this pro-inflammatory response was strongly reduced by a pretreatment with antioxidant enzymes, such as PEG-SOD and PEG-CAT. Therefore, we hypothesize that the NiONPs-induced pro-inflammatory response might be closely related to oxidative stress, a relationship often highlighted after NP exposure (Nel et al. 2006). In addition, there is evidence that oxidative stress contributes to the pathophysiology of vascular diseases, along with inflammation, which plays an important role in cardiovascular diseases (Rafikova, Al Ghouleh, and Rafikov 2019).

Given the importance of calcium signaling in endothelial dysfunction, the effect of NiONPs exposure on calcium signaling was evaluated in HPAEC. NiONPs increased the basal calcium level, in a concentration-dependent manner (Figure 4(A,B)). This observation is in line with the previously published data after NiONPs exposure on BEAS-2B cells (DI Bucchianico et al. 2018). Moreover, it seems important to determine whether the $[Ca^{2+}]_i$ increase came from intracellular calcium stocks (such as ER) and/or from the extracellular source, especially via the calcium membrane channels disturbance. Our current finding of $[Ca^{2+}]_i$ rise being significantly reduced

after NiONPs exposure in the absence of extracellular calcium, is strong evidence in favor of the second hypothesis. In addition, TRPV4 channel activity was reduced and, by blocking that TRPV4 channel activity with an antagonist, no calcium homeostasis alteration was then observed. Regarding the implication of intracellular calcium stores, an increase in $[Ca^{2+}]_{ER}$ was observed. Indeed, ER also acts as a calcium buffer site that regulates intracellular calcium homeostasis (Marchi et al. 2018). All of the results can be explained by the membrane calcium channel alterations. Indeed, a previous study has shown that metallic oxide NPs, that is, CeONPs, can interact with the membrane calcium channels (Xiang et al. 2016). Stretch-activated channels are particularly involved in the calcium influx of vascular cells, and they might be a target site of NPs. Previous studies have shown that silica NPs interact with TRPV channels in airway epithelial cells by specifically inhibiting TRPV4. The later interaction is responsible for physiological dysfunctions in the respiratory tract of mice (Sanchez et al. 2017). Likewise, our findings suggest that NiONPs interact with TRPV4 channels (Figure 5).

It is interesting to note that $[Ca^{2+}]_i$ rise differs according to the type of particles as well as their size and their physicochemical characteristics. Indeed, in A549 cells, $NiCl_2$ (20 μM), increases calcium release from intracellular calcium stores (Cortijo et al. 2010), such as in HPAEC after carbon black NPs exposure (Deweirdt et al. 2020). Another study in rat pulmonary artery smooth muscle cells shows that SiO_2 NPs exposure, increases $[Ca^{2+}]_i$ originating from both extracellular and intracellular calcium sources, with an implication of TRPV (Dubes et al. 2017). All these results suggest that metallic NPs physicochemical characteristics are important in calcium signaling alteration in different vascular cells, mainly through alterations of membrane calcium channels.

$[Ca^{2+}]_i$ homeostasis alteration may originate from oxidative stress (Gordeeva, Zvyagilskaya, and Labas 2003). In a previous study on HPAEC, we showed that carbon black NPs (13 nm)-induced alteration in intracellular calcium homeostasis was closely related to oxidative stress (Deweirdt et al. 2020). In this previous study, the $[Ca^{2+}]_i$ rise was also reduced by pretreatment with antioxidant enzymes, as observed in this present study with NiONPs.

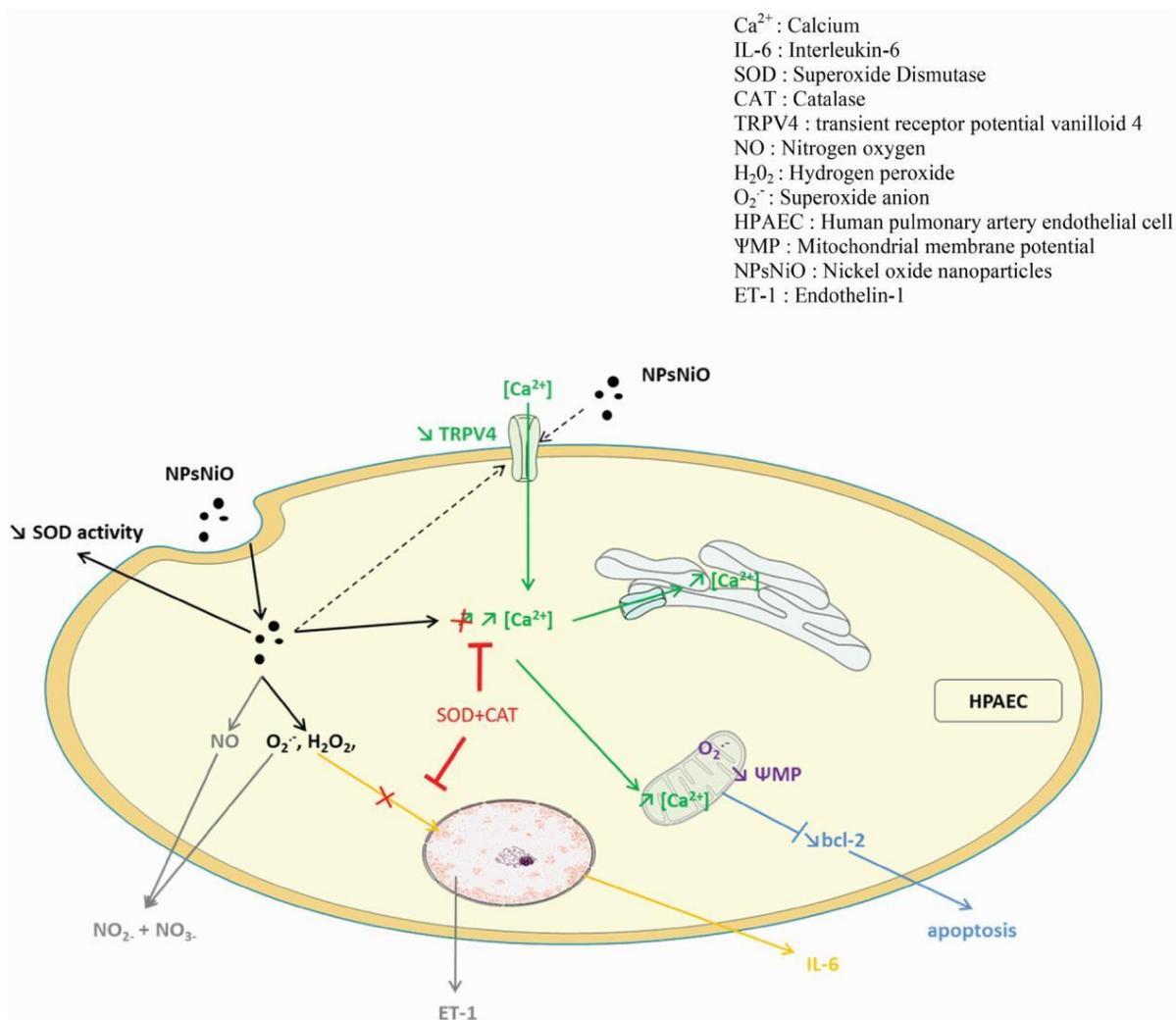


Figure 8. Summary of main results. NPsNiO caused damages that was dependent on oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

However, such pretreatment did not fully restore calcium homeostasis thus indicating that oxidative stress was not the only mechanism responsible.

NiONPs could also alter mitochondrial function, especially because of the localization of NiONPs in the cytoplasm near the mitochondria, because of the importance of oxidative stress implication, and of the disruption of calcium homeostasis. Indeed, ROS, such as O_2^- may induce mitochondrial membrane lipoperoxidation, leading to the impairment of mitochondrial membrane potential. The later alterations can dysregulate the mitochondrial respiratory chain, the β -oxidation, or induce apoptosis (Prakash, Pabelick, and Sieck 2017). In the current study, a disruption of mitochondrial activity after NiONPs exposure was highlighted with: (i) an overproduction of mitochondrial O_2^- ; (ii) a $[\text{Ca}^{2+}]_m$

rise; (iii) a decrease in mitochondrial membrane potential and (iv) a decrease in mitochondrial mass (Figures 2 and 4 and Figure 6). Then, the apoptosis was evaluated and our results showed an increase in apoptotic cell number (Figure 7(A,B)). Apoptosis has previously been detected in BEAS-2B cells and in HUVECs, after exposures to NiONPs and SiNPs (Duan et al. 2015; Guo et al. 2018). Moreover, the decrease of anti-apoptotic factor bcl-2 expression observed in HPAEC after NiONPs exposure confirmed involvement of the apoptosis pathway. Interestingly, an alteration of bcl-2 expression was also observed in BEAS-2B after titanium oxide NPs exposure (Shi et al. 2010). The present results demonstrate that the main mechanism of cell death after NiONPs exposure involves mitochondria alteration-mediated apoptosis, which could lead to

endothelial dysfunction causing pulmonary vascular diseases (Chambers, Rounds, and Lu 2018). Another study also reports that cardiovascular diseases are associated with mitochondrial impairment (Chistiakov et al. 2018).

Finally, NO plays an important vasculoprotective role regulated by calcium concentration. Based on our results regarding NiONPs-induced homeostasis calcium alteration, we decided to further study NO production. Moreover, it is well known that the unstable O_2^- can react with NO. After a 4 h-exposure to NiONPs, an increase of NO production was observed in HPAEC (Figure 7(C)). However, after a 24 h-exposure a decrease of NO production was noticed. The decrease in NO bioavailability might be explained by a rapid kinetic reaction between NO and O_2^- to form metabolites such as peroxynitrites. The later toxic molecules may be involved in the aggravation of cardiovascular diseases (Pacher, Beckman, and Liaudet 2007). Consequently, the production of NO metabolites (i.e. nitrites, nitrates), which reflects the peroxynitrites production, was analyzed. Our results showed a significant increase in NO metabolites. Furthermore, after a 24 h-exposure to NiONPs, we detected a significant increase in ET-1 which is a mediator of vasoconstriction. Production of NO toxic metabolites associated with the decrease of NO bioavailability and the increase in ET-1 production could result in an imbalance between relaxation/contraction of smooth muscle cells in favor of contraction resulting in an altered vascular reactivity state, one of the critical events involved in PH (Billaud et al. 2009).

Our results are summarized in Figure 8.

Conclusion

The present study shows that NiONPs primarily induce an intracellular ROS overproduction in HPAEC, leading to a pro-inflammatory response and a $[Ca^{2+}]_i$ rise. Disruption of intracellular calcium homeostasis can be explained by alterations of membrane calcium channels, particularly the TRPV4 channels, and at least in part by oxidative stress. In addition, NiONPs trigger endothelial toxicity through mitochondrial dysfunction which is characterized by (1) mitochondrial ROS generation, (2) mitochondrial membrane potential alteration, and (3) mitochondrial calcium overload. Furthermore,

we have demonstrated that NiONPs induce endothelial apoptosis as a result of their toxic effects. Finally, the decrease in NO bioavailability may contribute to an alteration of the vascular reactivity and to endothelial dysfunction, which are both critical pathophysiological mechanisms underlying many vascular diseases. Thus, one can assume that the workers and the population exposed to NiONPs in New Caledonia may be at risk to develop exacerbation of preexisting vascular diseases.

Acknowledgments

The authors thank Ms. C. Freund-Chapellier for her constructive remarks on the linguistic content of the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The author(s) reported there is no funding associated with the work featured in this article.

ORCID

Magalie Baudrimont  <http://orcid.org/0000-0001-9901-8435>

References

- Abdal Dayem, A., M. K. Hossain, S. B. Lee, K. Kim, S. K. Saha, G. M. Yang, H. Y. Choi, and S. G. Cho. 2017. "The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1): 120.
- Ahamed, M. 2011. "Toxic Response of Nickel Nanoparticles in Human Lung Epithelial A549 Cells." *Toxicology in Vitro* 25 (4): 930–936.
- Akerlund, E., M. S. Islam, S. Mccarrick, E. Alfaro-Moreno, and H. L. Karlsson. 2019. "Inflammation and (Secondary) Genotoxicity of Ni and NiO Nanoparticles." *Nanotoxicology* 13 (8): 1060–1072.
- Andersen, I., and K. B. Svenes. 1989. "Determination of Nickel in Lung Specimens of Thirty-Nine Autopsied Nickel Workers." *International Archives of Occupational and Environmental Health* 61 (4): 289–295.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, and H. L. Roderick. 2003. "Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–529.

- Billaud, M., R. Marthan, J. P. Savineau, and C. Guibert. 2009. "Vascular Smooth Muscle Modulates Endothelial Control of Vasoreactivity via Reactive Oxygen Species Production through Myoendothelial Communications." *PLoS One* 4 (7): e6432.
- Cao, Y., Y. Gong, L. Liu, Y. Zhou, X. Fang, C. Zhang, Y. Li, and J. Li. 2017. "The Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) as an in Vitro Model to Assess the Toxicity of Nanoparticles to Endothelium: A Review." *Journal of Applied Toxicology* 37 (12): 1359–1369. doi:10.1002/jat.3470.
- Capasso, L., M. Camatini, and M. Gualtieri. 2014. "Nickel Oxide Nanoparticles Induce Inflammation and Genotoxic Effect in Lung Epithelial Cells." *Toxicology Letters* 226 (1): 28–34.
- Chambers, E., S. Rounds, and Q. Lu. 2018. "Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis in Emphysema and Acute Lung Injury." *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology* 228: 63–86.
- Chang, X. H., A. Zhu, F. F. Liu, L. Y. Zou, L. Su, S. K. Liu, H. H. Zhou, et al. 2017. "Nickel Oxide Nanoparticles Induced Pulmonary Fibrosis via TGF- β 1 Activation in Rats." *Human & Experimental Toxicology* 36 (8): 802–812.
- Chen, X., Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen, and Y. Wang. 2010. "2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a Fluorescent Probe for Reactive Oxygen Species Measurement: Forty Years of Application and Controversy." *Free Radical Research* 44 (6): 587–604.
- Chistiakov, D. A., T. P. Shkurat, A. A. Melnichenko, A. V. Grechko, and A. N. Orekhov. 2018. "The Role of Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Disease: A Brief Review." *Annals of Medicine* 50 (2): 121–127.
- Cortijo, J., J. Milara, M. Mata, E. Donet, N. Gavara, S. E. Peel, I. P. Hall, and E. J. Morcillo. 2010. "Nickel Induces Intracellular Calcium Mobilization and Pathophysiological Responses in Human Cultured Airway Epithelial Cells." *Chemico-Biological Interactions* 183 (1): 25–33.
- Courtois, A., P. Andujar, Y. Ladeiro, T. Ducret, F. Rogerieux, G. Lacroix, I. Baudrimont, et al. 2010. "Effect of Engineered Nanoparticles on Vasomotor Responses in Rat Intrapulmonary Artery." *Toxicology and Applied Pharmacology* 245 (2): 203–210.
- Deweirdt, J., J. F. Quignard, B. Crobeddu, A. Baeza-Squiban, J. Sciare, A. Courtois, S. Lacomme, et al. 2017. "Involvement of Oxidative Stress and Calcium Signaling in Airborne Particulate Matter - Induced Damages in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells." *Toxicology in Vitro* 45 (3): 340–350.
- Deweirdt, J., J. F. Quignard, S. Lacomme, E. Gontier, S. Mornet, J. P. Savineau, R. Marthan, C. Guibert, and I. Baudrimont. 2020. "In Vitro Study of Carbon Black Nanoparticles on Human Pulmonary Artery Endothelial Cells: Effects on Calcium Signaling and Mitochondrial Alterations." *Archives of Toxicology* 94 (7): 2331–2348. doi:10.1007/s00204-020-02764-9.
- Di Bucchianico, S., A. R. Gliga, E. Akerlund, S. Skoglund, I. O. Wallinder, B. Fadeel, and H. L. Karlsson. 2018. "Calcium-Dependent Cyto- and Genotoxicity of Nickel Metal and Nickel Oxide Nanoparticles in Human Lung Cells." *Particle and Fibre Toxicology* 15 (1): 32.
- Dikalov, S. I., I. A. Kirilyuk, M. Voinov, and I. A. Grigor'Ev. 2011. "EPR Detection of Cellular and Mitochondrial Superoxide Using Cyclic Hydroxylamines." *Free Radical Research* 45 (4): 417–430.
- Duan, W. X., M. D. He, L. Mao, F. H. Qian, Y. M. Li, H. F. Pi, C. Liu, et al. 2015. "NiO Nanoparticles Induce Apoptosis through Repressing SIRT1 in Human Bronchial Epithelial Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 286 (2): 80–91.
- Dubes, V., T. Parpaite, T. Ducret, J. F. Quignard, S. Mornet, N. Reinhardt, I. Baudrimont, et al. 2017. "Calcium Signalling Induced by in Vitro Exposure to Silicon Dioxide Nanoparticles in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells." *Toxicology* 375: 37–47.
- Ducret, T., J. EL Arrouchi, A. Courtois, J. F. Quignard, R. Marthan, and J. P. Savineau. 2010. "Stretch-Activated Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells from Normoxic and Chronically Hypoxic Rats." *Cell Calcium* 48 (5): 251–259.
- Filippini, A., A. D'Amore, and A. D'Alessio. 2019. "Calcium Mobilization in Endothelial Cell Functions." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18): 4525.
- Gordeeva, A. V., R. A. Zvyagil'skaya, and Y. A. Labas. 2003. "Cross-Talk between Reactive Oxygen Species and Calcium in Living Cells." *Biochemistry* 68 (10): 1077–1080.
- Goswami, C., J. Kuhn, P. A. Heppenstall, and T. Hucho. 2010. "Importance of Non-Selective Cation Channel TRPV4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells." *PLoS One* 5 (7): e11654.
- Guibert, C., R. Marthan, and J. P. Savineau. 2007. "Modulation of Ion Channels in Pulmonary Arterial Hypertension." *Current Pharmaceutical Design* 13 (24): 2443–2455.
- Guo, C., R. Ma, X. Liu, Y. Xia, P. Niu, J. Ma, X. Zhou, Y. Li, and Z. Sun. 2018. "Silica Nanoparticles Induced Endothelial Apoptosis via Endoplasmic Reticulum Stress-Mitochondrial Apoptotic Signaling Pathway." *Chemosphere* 210: 183–192.
- He, Z. L., X. E. Yang, and P. J. Stoffella. 2005. "Trace Elements in Agroecosystems and Impacts on the Environment." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19 (2–3): 125–140. doi:10.1016/j.jtemb.2005.02.010.
- Horemans, B., C. Van Holsbeke, W. Vos, L. Darchuk, V. Novakovic, A. C. Fontan, J. De Backer, R. Van Grieken, W. De Backer, and K. De Wael. 2012. "Particle Deposition in Airways of Chronic Respiratory Patients Exposed to an Urban Aerosol." *Environmental Science & Technology* 46 (21): 12162–12169. doi:10.1021/es302755s.
- Imran Din, M., and A. Rani. 2016. "Recent Advances in the Synthesis and Stabilization of Nickel and Nickel Oxide Nanoparticles: A Green Adeptness." *International Journal of Analytical Chemistry* 2016: 1–14. doi:10.1155/2016/3512145.
- Isnard, S., L. L'Huillier, F. Rigault, and T. Jaffré. 2016. "How Did the Ultramafic Soils Shape the Flora of the New

- Caledonian Hotspot?" *Plant and Soil* 403 (1–2): 53–76. doi: 10.1007/s11104-016-2910-5.
- Ivask, A., T. Titma, M. Visnapuu, H. Vija, A. Kakinen, M. Sihtmae, S. Pokhrel, et al. 2015. "Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types in Vitro." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 15 (18): 1914–1929.
- Karoly, E. D., Z. Li, L. A. Dailey, X. Hyseni, and Y. C. Huang. 2007. "Up-Regulation of Tissue Factor in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells after Ultrafine Particle Exposure." *Environmental Health Perspectives* 115 (4): 535–540. doi:10.1289/ehp.9556.
- Konczol, M., E. Goldenberg, S. Ebeling, B. Schafer, M. Garcia-Kaufer, R. Gminski, B. Grobety, et al. 2012. "Cellular Uptake and Toxic Effects of Fine and Ultrafine Metal-Sulfate Particles in Human A549 Lung Epithelial Cells." *Chemical Research in Toxicology* 25 (12): 2687–2703.
- Lai, N., W. Lu, and J. Wang. 2015. "Ca(2+) and Ion Channels in Hypoxia-Mediated Pulmonary Hypertension." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (2): 1081–1092.
- Latvala, S., J. Hedberg, S. Di Bucchianico, L. Moller, I. Odnevall Wallinder, K. Elihn, and H. L. Karlsson. 2016. "Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles." *PLoS One* 11 (7): e0159684.
- Losfeld, G., L. L'Huillier, B. Fogliani, T. Jaffre, and C. Grison. 2015. "Mining in New Caledonia: Environmental Stakes and Restoration Opportunities." *Environmental Science and Pollution Research International* 22 (8): 5592–5607.
- Marchi, S., S. Patergnani, S. Missiroli, G. Morciano, A. Rimessi, M. R. Wieckowski, C. Giorgi, and P. Pinton. 2018. "Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Cell Death." *Cell Calcium* 69: 62–72.
- Miller, M. R., J. B. Raftis, J. P. Langrish, S. G. Mclean, P. Samutrtai, S. P. Connell, S. Wilson, et al. 2017. "Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease." *ACS Nano* 11 (5): 4542–4552. doi:10.1021/acsnano.6b08551.
- Mo, Y., M. Jiang, Y. Zhang, R. Wan, J. Li, C. J. Zhong, H. Li, S. Tang, and Q. Zhang. 2019. "Comparative Mouse Lung Injury by Nickel Nanoparticles with Differential Surface Modification." *Journal of Nanobiotechnology* 17 (1): 2.
- Mohamed, K., K. Zine, K. Fahima, E. Abdelfattah, S. M. Sharifudin, and K. Duduku. 2018. "NiO Nanoparticles Induce Cytotoxicity Mediated through ROS Generation and Impairing the Antioxidant Defense in the Human Lung Epithelial Cells (A549): Preventive Effect of Pistacia Lentiscus Essential Oil." *Toxicology Reports* 5: 480–488. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.03.012.
- Munoz, A., and M. Costa. 2012. "Elucidating the Mechanisms of Nickel Compound Uptake: A Review of Particulate and Nano-Nickel Endocytosis and Toxicity." *Toxicology and Applied Pharmacology* 260 (1): 1–16.
- Nel, A., T. Xia, L. Madler, and N. Li. 2006. "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel." *Science* 311 (5761): 622–627.
- Nemmar, A., P. H. M. 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 (4): 411–414.
- Norseth, T. 1994. "Environmental Pollution around Nickel Smelters in the Kola Peninsula (Russia)." *The Science of the Total Environment* 148 (2–3): 103–108.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. "Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles." *Environmental Health Perspectives* 113: 823–839.
- Pacher, P., J. S. Beckman, and L. Liaudet. 2007. "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease." *Physiological Reviews* 87 (1): 315–424.
- Parpaite, T., G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, P. Robillard, J. F. Quignard, R. Marthan, J. P. Savineau, and T. Ducret. 2016. "Effect of Hypoxia on TRPV1 and TRPV4 Channels in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells." *European Journal of Physiology* 468 (1): 111–130.
- Pasquet, C., P. Gunkel-Grillon, C. Laporte-Magoni, A. Serres, T. Quiniou, F. Rocca, F. Monna, R. Losno, F. Van Oort, and C. Chateau. 2016. "Alternative Dry Separation of PM10 from Soils for Characterization by Kinetic Extraction: Example of New Caledonian Mining Soils." *Environmental Science and Pollution Research International* 23 (24): 25105–25113.
- Prakash, Y. S., C. M. Pabelick, and G. C. Sieck. 2017. "Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease." *Chest* 152 (3): 618–626.
- Rafikova, O., I. Al Ghouleh, and R. Rafikov. 2019. "Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development." *Antioxidants & Redox Signaling* 31 (13): 933–953.
- Sanchez, A., J. L. Alvarez, K. Demydenko, C. Jung, Y. A. Alpizar, J. Alvarez-Collazo, S. M. Cokic, M. A. Valverde, P. H. Hoet, and K. Talavera. 2017. "Silica Nanoparticles Inhibit the Cation Channel TRPV4 in Airway Epithelial Cells." *Particle and Fibre Toxicology* 14 (1): 43.
- Sandow, S. L., S. Senadheera, T. H. Grayson, D. G. Welsh, and T. V. Murphy. 2012. "Calcium and Endothelium-Mediated Vasodilator Signaling." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740: 811–831.
- Senoh, H., H. Kano, M. Suzuki, M. Ohnishi, H. Kondo, K. Takanobu, Y. Umeda, S. Aiso, and S. Fukushima. 2017. "Comparison of Single or Multiple Intratracheal Administration for Pulmonary Toxic Responses of Nickel Oxide Nanoparticles in Rats." *Journal of Occupational Health* 59 (2): 112–121. doi:10.1539/joh.16-0184-OA.
- Shi, Y., F. Wang, J. He, S. Yadav, and H. Wang. 2010. "Titanium Dioxide Nanoparticles Cause Apoptosis in BEAS-2B Cells through the Caspase 8/t-Bid-Independent Mitochondrial Pathway." *Toxicology Letters* 196 (1): 21–27.
- Sies, H., C. Berndt, and D. P. Jones. 2017. "Oxidative Stress." *Annual Review of Biochemistry* 86: 715–748.
- Sioutas, C., R. J. Delfino, and M. Singh. 2005. "Exposure Assessment for Atmospheric Ultrafine Particles (UFPs) and Implications in Epidemiologic Research." *Environmental Health Perspectives* 113 (8): 947–955. doi:10.1289/ehp.7939.

- St-Jean, A., Y. Barguil, Y. Dominique, L. E. B. Bot, P. Ayotte, and S. Cordier. 2018. "Nickel and Associated Metals in New Caledonia: Exposure Levels and Their Determinants." *Environment International* 118: 106–115.
- Xiang, J., J. Li, J. He, X. Tang, C. Dou, Z. Cao, B. Yu, et al. 2016. "Cerium Oxide Nanoparticle Modified Scaffold Interface Enhances Vascularization of Bone Grafts by Activating Calcium Channel of Mesenchymal Stem Cells." *ACS Applied Materials & Interfaces* 8 (7): 4489–4499.
- Ying, Z., X. Xu, M. Chen, D. Liu, M. Zhong, L. C. Chen, Q. Sun, and S. Rajagopalan. 2013. "A Synergistic Vascular Effect of Airborne Particulate Matter and Nickel in a Mouse Model." *Toxicological Sciences* 135 (1): 72–80. doi:10.1093/toxsci/kft136.
- Yokel, R. A., S. M. Lasley, and D. C. Dorman. 2006. "The Speciation of Metals in Mammals Influences Their Toxicokinetics and Toxicodynamics and Therefore Human Health Risk Assessment." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 9 (1): 63–85.
- Zhang, R., C. Jia, L. Zhao, J. Pan, Q. Niu, and R. Liu. 2019. "Characterization of the Interaction between Carbon Black and Three Important Antioxidant Proteins Using Multi Spectroscopy and Modeling Simulations." *Chemosphere* 222: 823–830.
- Zhang, H., Z. Ji, T. Xia, H. Meng, C. Low-Kam, R. Liu, S. Pokhrel, et al. 2012. "Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap to Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation." *ACS Nano* 6 (5): 4349–4368.
- Zheng, Y., B. Zhu, H. Chen, W. You, C. Jiang, and J. Yu. 2017. "Hierarchical Flower-like Nickel(II) Oxide Microspheres with High Adsorption Capacity of Congo Red in Water." *Journal of Colloid and Interface Science* 504: 688–696.

Résumé et conclusion :

A travers cet article, nous avons élucidé une partie des mécanismes de toxicité des NPs de NiO sur des HPAEC.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les NPs de NiO dans le milieu de culture et avons montré que ces NPs sont particulièrement réactives dans la mesure où elles entraînent, en conditions acellulaires, une production intrinsèque d'ERO. Dans un deuxième temps, nous avons démontré que les NPs de NiO sont rapidement internalisées, sous forme d'agrégats dans le cytoplasme, dont certains relativement proches des mitochondries. Cette internalisation pourrait expliquer la forte cytotoxicité des NPs de NiO qui entraîne presque 30 % de mortalité cellulaire à seulement 5 µg/cm².

Nos résultats montrent, ensuite, qu'après 4 h d'exposition, les NPs de NiO induisent un stress oxydant important, d'une part, via la production d'ERO globales et, notamment d'O₂^{•-} cytoplasmique et mitochondrial, et, d'autre part, par une diminution de l'activité de la SOD. Il a, également, été montré que le stress oxydant généré pouvait être à l'origine de l'activation des voies de l'inflammation, entraînant, ainsi, une augmentation de la sécrétion d'IL6.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet des NPs de NiO sur la signalisation calcique. Après 4 h d'exposition, les NPs induisent une perturbation de l'homéostasie calcique en partie due au stress oxydant mais, également, à une altération des canaux TRPV4. Ces altérations sont à l'origine d'une entrée massive du calcium du milieu extracellulaire vers le cytoplasme, ainsi que d'une augmentation de la concentration du calcium dans le RE et dans les mitochondries. Les mitochondries sont particulièrement altérées par les NPs de NiO, d'une part, par le stress oxydant mitochondrial et par la perturbation de l'homéostasie calcique et, d'autre part, par la diminution du potentiel membranaire mitochondrial et de la masse mitochondriale. Il a enfin été montré que ces phénomènes activent, ensuite, la voie de l'apoptose mise en évidence par une augmentation du nombre de cellules apoptotiques et une diminution de l'expression de *bcl-2*.

Dans une dernière étape, nous avons montré que les NPs de NiO entraînent une altération de la voie de signalisation du NO. Nous avons observé, d'une part, une augmentation de la production de NO, après 4 h d'exposition et, d'autre part, une diminution significative de la concentration de NO au cours du temps. Ces résultats s'expliquent, notamment, par la réaction rapide de cette molécule avec l'O₂^{•-}. De plus, il a été observé une augmentation significative de la production des métabolites du NO tels que les nitrites et les nitrates, après

24 h d'exposition avec les NPs de NiO. Enfin, nous avons détecté, après 24 h d'intoxication, une augmentation de la concentration d'ET-1, marqueur de l'HTP.

En conclusion, toutes ces altérations sont autant de phénomènes également observés dans les maladies cardiovasculaires telle que l'HTP. Ces résultats suggèrent donc que l'exposition aux NPs de NiO pourrait aggraver certains événements physiopathologiques chez les travailleurs miniers et les populations environnantes souffrant de maladies cardiovasculaires préexistantes telle que l'HTP et que ces patients seraient plus sensibles à ces polluants particuliers.

2. Hépatocytes d'anguilles exposés aux NPs de NiO et aux sels de NiCl₂

Contexte :

Les sols miniers en Nouvelle-Calédonie sont une source importante de pollution des cours d'eau douce en aval des mines par les métaux qui persistent longtemps dans l'environnement aquatique, notamment, à cause du lessivage des sols qui retiennent peu l'eau (Singh et al., 2005, Ashraf et al., 2011b, Nouri et al., 2008b, Nouri et al., 2008a, Xia et al., 2006, Wiesner et al., 2006). De plus, les sols calédoniens sont instables et sensibles à l'érosion (Ambatsian et al., 1997), ce qui entraîne l'émission atmosphérique de particules de Ni qui vont pouvoir se retrouver dans les écosystèmes aquatiques par dépôt ou lixiviation, et affecter les organismes vivants. Pour rappel, en Nouvelle-Calédonie, la concentration moyenne en nickel dans les rivières des zones minières est de 96 µg/L par rapport à celles éloignées des mines qui est de 7 µg/L (Migon et al., 2007, Boula et al., 2022). Le Ni peut alors se retrouver sous différentes formes dans les eaux douces. Dues aux activités minières, des NPs de NiO peuvent se déposer dans les rivières, mais on retrouve, également, des sels de nickel, tel que le NiCl₂, présents naturellement dans les eaux douces sur sols ultramafiques. Des premières études *in vivo* ont permis de montrer que l'exploitation du Ni en Nouvelle-Calédonie contribue à la dégradation des écosystèmes végétaux et aquatiques naturels et des lagons (Hedouin et al., 2007, Kettle et al., 2007, Bonnet et al., 2014, Gunkel-Grillon et al., 2014).

Il a, également, été mis en évidence une bioaccumulation importante du Ni dans les branchies et le foie de cinq espèces de poissons vivants dans des rivières sous influence minière, dont l'anguille marbrée (CNRT-Nickel). La fonction hépatique chez le poisson, en particulier chez l'anguille, joue un rôle clé dans le métabolisme des xénobiotiques, le métabolisme des lipides et également la reproduction. L'accumulation de métaux dans cet organe peut conduire à un dysfonctionnement hépatique, affectant potentiellement l'achèvement du cycle de vie du poisson (Pierron et al., 2008, Pierron et al., 2007). Le peu d'études *in vitro* réalisées sur des hépatocytes de poissons (truite arc-en-ciel, mérrou à taches orange, poisson-chat) a montré que les NPs métalliques généraient un stress oxydant, une altération de la signalisation calcique et un dysfonctionnement mitochondrial, événements critiques impliqués dans la mort des hépatocytes (Kunjiappan et al., 2015, Wang et al., 2016, Ostaszewska et al., 2018, Massarsky et al., 2014, Bermejo-Nogales et al., 2016). Le stress oxydant a été identifié comme un mécanisme majeur des dommages cellulaires induits par les NPs pouvant ensuite entraîner

une réaction inflammatoire et des altérations mitochondriales et lipidiques (Ivask et al., 2015, Görlach et al., 2015, Germande et al., 2022, Arruda et al., 2014, Rieusset, 2017). Cependant, bien que le dysfonctionnement du foie soit connu pour jouer un rôle majeur dans l'altération du métabolisme des lipides, et, par conséquent, dans la migration et la reproduction de l'anguille, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents par lesquels les particules de Ni altèrent la signalisation calcique et la fonction mitochondriale dans les hépatocytes d'anguille n'ont pas encore été documentés.

Objectifs :

À cet égard, les objectifs de notre étude *in vitro* sont d'évaluer les mécanismes de toxicité des NPs de NiO dans les hépatocytes d'anguille afin de comprendre comment la fonction hépatique peut être affectée, et de comparer ces effets à ceux observés sur les cellules HPAEC afin de potentiellement dégager des mécanismes d'action communs sur les deux types cellulaires. Aujourd'hui, il n'existe pas de lignée cellulaire d'hépatocytes d'*Anguilla marmorata*, c'est pourquoi notre étude porte sur une lignée cellulaire d'hépatocytes d'*Anguilla japonica*, HEPA-E1, la seule lignée cellulaire d'hépatocytes d'anguille existante. Cependant, les deux espèces sont génétiquement très proches et partagent des zones géographiques communes en tant qu'anguilles du Pacifique, comme mentionné en introduction (Kuroki et al., 2009, Kuroki et al., 2006, Chen et al., 2018). Pour répondre à notre objectif sur les HEPA-E1, différents paramètres sont étudiés (i) la cytotoxicité, (ii) le stress oxydant, (iii) l'inflammation, (iv) la signalisation calcique, (v) le dysfonctionnement mitochondrial et (vi) l'apoptose.

Un deuxième axe d'étude avait pour but de comparer la toxicité des NPs de NiO aux sels de Ni, NiCl₂, afin d'évaluer sous quelle forme le Ni est le plus toxique, et si la toxicité des NPs de NiO ne peut pas être expliquée par un éventuel relargage de Ni dissous à partir des NPs dans le milieu de culture. Les différents paramètres étudiés sont (i) la cytotoxicité, (ii) le stress oxydant et (iii) l'inflammation.

2.1.Mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des NPs de NiO sur des hépatocytes d'anguille japonaise, *Anguilla Japonica*, HEPA-E1 : illustration de l'impact des rejets de Ni issus de l'activité minière en Nouvelle-Calédonie.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Cellular and molecular mechanisms of NiONPs toxicity on eel hepatocytes HEPA-E1: An illustration of the impact of Ni release from mining activity in New Caledonia

Ophélie Germande^{a,b,c}, Fabien Beaufiles^{a,b,d}, Guillemine Daffe^e, Patrice Gonzalez^{a,c}, Stéphane Mornet^f, Megi Bejko^f, Marie-Hélène Errera^g, Sabrina Lacomme^{a,h}, Etienne Gontier^{a,h}, Christelle Guibert^b, Isabelle Baudrimont^{a,b,1}, Magalie Baudrimont^{a,c,1,*}

^a Univ. Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux, F-33076, France

^b Inserm U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, avenue du Haut Lèveque, Pessac, F-33604, France

^c Univ. Bordeaux, CNRS, EPHE, UMR EPOC 5805, F-33615, Pessac, France

^d CHU de Bordeaux, Service d'exploration fonctionnelle respiratoire, Service de Pédiatrie médicale, Bordeaux, F-33076, France

^e Univ. Bordeaux, CNRS, Observatoire Aquitain des Sciences de l'Univers, UAR 2567 POREA, F-33615, Pessac, France

^f Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, ICMGB, UMR 5026, F-33076, Bordeaux, France

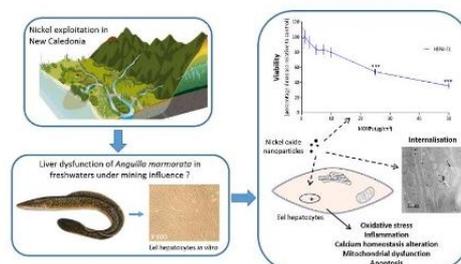
^g Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA

^h Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center, BIC, UAR CNRS 3420, US 004, F-33000, Bordeaux, France

HIGHLIGHTS

- NiONPs decrease cell viability and induce a ROS overproduction in eel hepatocytes.
- Oxidative stress leads to a [Ca²⁺] rise and a pro-inflammatory response in HEPA-E1.
- In mitochondria, NiONPs induce ROS generation, ΨMP collapse and Ca²⁺ overload.
- NiONPs adverse effects could compromise lipid metabolism and reproduction of eels.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Handling Editor: James Lazorchak

Keywords:

New Caledonia
Nickel oxide nanoparticles
Eel hepatocytes
Oxidative stress
Mitochondria alteration
Anguilla marmorata

ABSTRACT

Anthropic activities such as open pit mining, amplify the natural erosion of metals contained in the soils, particularly in New Caledonia, leading to atmospheric emission of nickel oxide nanoparticles (NiONPs). These particles are produced during extraction end up in aquatic ecosystems through deposition or leaching in the rivers. Despite alarming freshwater Ni concentrations, only few studies have focused on the cellular and molecular mechanisms of NiONPs toxicity on aquatic organisms and particularly on eels. Those fish are known to be sensitive to metal contamination, especially their liver, which is a key organ for lipid metabolism, detoxification and reproduction. The objective of this study was to assess *in vitro* the cytotoxic effects of NiONPs on *Anguilla japonica* hepatocytes, HEPA-E1. HEPA-E1 were exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 4 or 24 h. Several

* Corresponding author. Univ. Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux, F-33076, France.

E-mail address: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr (M. Baudrimont).

¹ Co-last authors. isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr, magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135158>

Received 6 March 2022; Received in revised form 25 May 2022; Accepted 26 May 2022

Available online 28 May 2022

0045-6535/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

endpoints were studied: (i) viability, (ii) ROS production, SOD activity and selected anti-oxidant genes expression, (iii) inflammation, (iv) calcium signalling, (v) mitochondrial function and (vi) apoptosis. The results evidenced that NiONPs induce a decrease of cell viability and an increase in oxidative stress with a significant superoxide anion production. An increase of mitochondrial calcium concentration and a decrease of mitochondrial membrane potential were observed, leading to apoptosis. These results underline the potential toxic impact of NiONPs on eels living in mining areas. Therefore, eel exposure to NiONPs can affect their migration and reproduction in New Caledonia.

1. Introduction

Nowadays, mining activities represent the second source of heavy metal contamination in soils (Singh et al., 2005). Mine tailings are subject to significant metal leaching due to the high concentration of heavy metals and the low capacity of soils to retain water and metals (Ashraf et al., 2011). Therefore, mining soils are an important source of contamination for watercourse and hence metals remain persistent in aquatic environment for a long time (Nouri et al., 2008). This issue is particularly important in New Caledonia, one of the largest nickel (Ni) producer in the world with resources concentrated in ultramafic formations characterized by a high concentration of metal trace elements including nickel, chromium (Cr), cobalt (Co), and manganese (Mn) that cover nearly 30% of the New Caledonian subsoils (Losfeld et al., 2015; Isnard et al., 2016). Natural erosion, due to the laterite soils fragility and instability (Ambatsian et al., 1997), is amplified by anthropic activities such as mining, and leads to atmospheric emission of ultrafine particles (UFPs), such as Ni UFPs (He et al., 2005; Pasquet et al., 2016). UFPs are called nanoparticles (NPs) once manufactured. The hydrometallurgical process that is used in New Caledonia contributes to the Ni UFPs oxidation that mostly generates nickel oxide NPs (NiONPs), used in many areas of industry (Imran Din and Rani, 2016). In coastal region with nickel industry, like in New Caledonia, the NiONPs production due to the welding fumes is a potential nano-pollution source of freshwater downstream the mine by end up in aquatic ecosystem through deposition, or through leaching, affecting living organisms (Wiesner et al., 2006). In New Caledonia, this pollution is confirmed by high nickel concentrations in rivers in mining areas (12.3–23 µg/L) compared to those away from mining (0.05–2.9 µg/L) whereas the European regulation advises to not exceed 4 µg/L (AEL, ValeNC 2013; Soproner, SLN, 2013) (Migon et al., 2007). The extended use of NiONPs in industry may contribute to an augmentation of particulate matter emission and, consequently, to an increase of bioaccumulation of Ni in fish living in freshwaters. In addition, previous studies have highlighted that exploitation of nickel in New Caledonia contributes to the natural ecosystems and lagoon degradation. Indeed, genetic alterations in the plant such as conifers *Araucaria nemorosa* are reported as well as a significant bioaccumulation of Ni and Cr on coral reef fish (moray eels and congers), sediments and freshwater bivalves (Hedouin et al., 2007; Kettle et al., 2007; Bonnet et al., 2014; Gunkel-Grillon et al., 2014). Some studies have highlighted the significant bioaccumulation of nickel in gills and livers of five fish species (*Khulia rupestris*, *Awaous guamensis* and *Sicyopterus lagocephalus*, *Sarotherodon occidentalis* and *Anguilla marmorata*, marbled eels) living in rivers under mining influence (DMML project, CNRT-2016). Among those species, *Anguilla marmorata* are particularly interesting. Firstly, eels are good bio-indicators of water metal contamination (Barak and Mason, 1990; van der Oost et al., 2002), especially as predators at the end of the trophic chain, potentially accumulating metals consumed by other species. Secondly, eels have a complex biological cycle with different stages of metamorphoses as previously described (Van Ginneken and Maes, 2005). During their juvenile growth stage, eels live several years in freshwaters accumulating nutrients and storing lipids before beginning several month of migration without eating and fasting reproduction in open sea, tens of thousands of miles away. During this migration, eels use the stored energy to swim and mature their gonads. Therefore, the quality of lipid storage and

metabolisation during growth in freshwaters is essential to ensure the success of migration and reproduction (Boetius and Boetius, 1980; Van Ginneken and Maes, 2005). To ensure a good lipid metabolisation, the liver is particularly important. However, eel liver concentrates high levels of different metals like cadmium, mercury, or nickel (Usero et al., 2004; Turan et al., 2020), because it represents the main organ of metal detoxification by scavenging metals on metallothionein (Gonzalez et al., 2006). Nevertheless, accumulation of metals can lead to liver dysfunction, potentially affecting the completion of the fish life cycle. Indeed, it has been previously shown in the European eel that this contamination can affect the lipid storage by altering the expression level of several lipolysis and lipogenesis enzymes leading to an increase in lipid consumption (Pierron et al., 2007). Lipid storage essential to provide the energy necessary for their migration is thus altered (Larsson et al., 1990), and eels have insufficient energy reserves to perform migration and maturation of their gonads, which directly impairs their reproduction (Pierron et al., 2008).

In vitro studies on fish hepatocytes (rainbow trout, orange-spotted grouper, catfish) have shown that metal NPs (copper-NPs; metal oxide NPs and argent-NPs) cause oxidative stress, calcium signalling alteration and mitochondrial dysfunction, which are critical events involved in hepatocytes death (Kunjiappan et al., 2015; Wang et al., 2016; Ostaszewska et al., 2018). Oxidative stress has been identified as the common mechanism of cellular damage and cytotoxicity after NPs exposure (Ivask et al., 2015). The reactive oxygen species (ROS) generation after NPs exposure could then alter the calcium homeostasis (Görlach et al., 2015) which plays in hepatocytes a major role to ensure lipid metabolism as a co-factor for several enzymes involved in glycolysis, β -oxidation or lipogenesis. Calcium homeostasis is then controlled by intracellular stores (*i.e.*, endoplasmic reticulum, ER, or mitochondria), therefore, the impairment of mitochondrial function may lead to an alteration of calcium homeostasis, and of hepatocytes metabolism by causing histopathologically an alteration of the liver (Arruda et al., 2014; Rieusset, 2017).

The high level of ROS production after NPs exposure has already been observed on hepatocytes from the rainbow trout (Massarsky et al., 2014), such as mitochondrial dysfunction (Bermejo-Nogales et al., 2016). Furthermore, histological alterations due to hepatocyte dysfunction has been observed in spiny eels, *Mastacembelus armatus*, that have been exposed to metals like copper, zinc, or Ni leading to a significant elevation in blood glucose and a decrease of liver glycogen, suggesting glycolytic alterations (Javed and Usmani, 2013). However, although the liver dysfunction is known to play a major role in lipids metabolism's alteration, and consequently in migration and reproduction of eel, the underlying cellular and molecular mechanisms by which NiONPs alter calcium signalling and mitochondrial function in eel hepatocytes have not yet been documented.

In this respect, the objectives of the proposed *in vitro* study were to assess the NiONPs-dependent cellular and molecular mechanisms of toxicity in eel hepatocytes to understand how liver function could be affected. Nowadays there is no hepatocyte cell line of *Anguilla marmorata*, that is why this study was carried out on *Anguilla japonica* (HEPA-E1) hepatocyte cell line, the only existing hepatocyte cell line from eel. However, the two species are genetically very close and share geographical areas as both species of Pacific eel (Kuroki et al., 2009; Chen et al., 2018). In the current study, we investigated the

NiONPs-induced HEPA-E1 (i) cytotoxicity, (ii) oxidative stress with ROS production and antioxidant enzymes activity and transcription, (iii) inflammation with cytokines secretion, (iv) calcium signalling in cytoplasm, ER and mitochondria, (v) mitochondrial dysfunction with mitochondrial mass and membrane potential and (vi) apoptosis with caspase and pro-apoptotic transcription factor.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Physiological salt solution (PSS) was composed of: 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg^{2+} and 2 mM Ca^{2+} ; adjusted at pH = 7.4. Krebs-HEPES Buffer (KHB) was composed of 118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 4 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES and 6 mM D-Glucose. Fluo-4-AM green dye (1 μ M), MitoSOX™ red dye (5 μ M), Fluo-4FF green dye (10 μ M), TMRM red dye (100 nM), and Hoechst 33342 blue dye (2 μ M) were obtained from ThermoFischer Scientific, Invitrogen™, except Rhod-2 AM red dye (1 μ M) from Euromedex®. All of the following chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich® and used as follows: superoxide dismutase–polyethylene glycol (PEG-SOD) and catalase–polyethylene glycol (PEG-CAT), as antioxidant enzymes, diluted in L15 M (300 U/mL and 600 U/mL, respectively).

2.2. Hepatocyte eel

Hepatocyte eel (HEPA-E1) isolated from japonica eel (*Anguilla japonica*) were purchased from Riken BRC Cell Bank® and were cultured in E-RDF medium (ERDF-M) (Kyokuto Pharmaceuticals®) supplemented with antibiotics 1% (Penicillin-Streptomycin, 1000 UI/100 000 UI, Sigma-Aldrich®), sodium bicarbonate $NaHCO_3$ (1130 mg/L), RD-1 supplement E-RDF (Kyokuto Pharmaceuticals®) and 5% of foetal bovine serum (FBS, Eurobio®) following manufacturer's guidelines. For all experiments cells were cultured in Leibovitz L-15 medium (L15 M) (Fischer Scientific®) supplemented with antibiotics 1%, 5% of FBS and 3% of GlutaMAX supplement (Fischer Scientific®) following manufacturer's guidelines. For all experiments, cells were seeded at the initial concentration of 20 000 cells/cm² per well in a 96, 24 or 12-well plate [corresponding respectively to 6600 cells/well (0.33 cm²), 38 000 cells/well (1.9 cm²) and 70 000 cells/well (3.5 cm²)] and cultured for 72 h, at 28 °C before assay.

2.3. NiO nanoparticles

2.3.1. NiO nanoparticles characterization

Nickel (II) oxide nanoparticles (NiONPs) (Cat. No.637130) were purchased from Sigma-Aldrich®. These particles were already described by (Di Bucchianico et al., 2018; Germande et al., 2022). Their mean aerodynamic diameter was 50 nm (as assessed by Transmission Electron Microscopy, TEM) and their characterization is presented in SI1. NPs were suspended in L15 M at a final stock solution concentration of 2 mg/mL. Prior to use, stock suspensions were vortexed, sonicated at 3 × 30 s (Vibracell 75186, 130 W, 56–60 Hz) and diluted extemporaneously in L15 M at appropriate concentrations for the different experiments (0.5–50 μ g/cm²). These concentrations were chosen on the basis of previous studies and expressed in μ g/cm² due to the NiONPs sedimentation in wells (Germande et al., 2022), corresponding respectively to 0.82–82.5 μ g/mL in a 96-well plate (0.33 cm²); 0.9–9.5 μ g/mL in a 24-well plate (1.9 cm²) and 1.2–12 μ g/mL in a 12-well plate (3.5 cm²). Concentrations (up to 5 μ g/cm²) reflect the atmospheric concentrations found in Noumea during pollution peaks (ScalAir) before sedimentation in the freshwaters (Gunkel-Grillon et al., 2014; Pasquet et al., 2018). Two time points were performed (4 h or/and 24 h) according to kinetic preliminary studies (results not shown).

2.3.2. NiONPs internalization

Transmission electronic microscopy (TEM) was used to study NiONPs internalization. Cells were seeded on plastic Lab-Teck chambers (Dutsher®), and cultured in supplemented L15 M before been exposed or not to NiONPs at 5 μ g/cm². After a 24 h-exposure to NiONPs, TEM process was performed as previously described (Deweirdt et al., 2017; Germande et al., 2022).

2.4. Cytotoxic assay

Cell viability was assessed by using the WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) cell proliferation reagent (Roche®) according to the manufacturer's recommendations and as already been described by (Deweirdt et al., 2017; Germande et al., 2022). After a 24 h - exposure with NiONPs (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 and 50 μ g/cm²), cells were rinsed with L15 M and incubated with WST-1 reagent. The absorbance was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany). The working concentrations for all further experiments in which mortality rate was less than 30% were all determined with this test (0.5–5 μ g/cm²).

2.5. Oxidative stress

Cells were exposed to NiONPs (0.5–5 μ g/cm²) for 4 or 24 h.

2.5.1. Global reactive oxygen species (ROS) production

Intracellular ROS production was assessed using the CM-H₂DCFDA probe (Fisher Scientific®), according to the manufacturer's recommendations and adapted and described from previous studies (Chen et al., 2010; Germande et al., 2022). Before a 4 h - NiONPs -exposure cells were pre-incubated with CM-H₂DCFDA probe (final concentration 20 μ M). Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at 485/520 nm (excitation/emission) by using FLUOstar Omega 2.10 plate reader, and the analyses were performed with MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®).

2.5.2. Cytoplasmic superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) production

Cytoplasmic $O_2^{\cdot-}$ detection was performed by electron paramagnetic resonance (EPR)-spin probe using CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine) (500 μ M), diethyldithiocarbamate (5 μ M) and deferoxamine (25 μ M) probes in KHB solution as previously described by (Germande et al., 2022). After a 4 h NiONPs - exposure, cells were incubated with probes before EPR analysis. All the EPR spectra were recorded using Spectrometer X Miniscope MS200 (Magnetech®). Following EPR spectra readings, protein quantities were measured by a Lowry-test (Lowry reagent, Sigma-Aldrich®), according to the manufacturer's recommendations. The results were normalized to protein quantities and expressed in EPR signal amplitude in arbitrary units AU/(mg/mL) of protein after a Lowry test.

2.5.3. Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production

Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production was assessed using MitoSOX™ red dye (ThermoFischer®), according to the manufacturer's recommendations by confocal microscopy (TE 2000, Nikon) and as previously described by (Germande et al., 2022). After a 4 h-exposure to NiONPs, cells were incubated with MitoSOX probe in PSS and with a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensity was measured for MitoSOX at 543/605 nm and Hoechst at 408/450 nm (excitation/emission). MitoSOX fluorescence intensity is proportional to the rate of the probe oxidation. Analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

2.5.4. Superoxide dismutase enzyme activity

The superoxide dismutase (SOD) activity was measured with a commercially available kit (19160 SED determination kit, Sigma-

Aldrich®) and determined by utilizing Dojindo's highly WST_1 as previously described by (Germande et al., 2022). After a 24 h-exposure with NiONPs supernatants and cells were used for analysis to determine both intracellular and extracellular SOD activity. Absorbance of supernatants and cells was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®).

2.6. Pro-inflammation effect: cytokines IL-6 production

Cells were exposed to NiONPs for 24 h and supernatants were collected, centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C and analysed using an ELISA assay kit (IL-6 DuoSet® ELISA R&D Systems) according to the manufacturer's guidelines. The absorbance was measured at 450 nm, corrected at 570 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano 2.10, BMG Labtech®).

2.7. Cytoplasmic, Endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium measurement

Variations in intracellular calcium $[Ca^{2+}]_c$, ER calcium $[Ca^{2+}]_{ER}$ and mitochondrial calcium $[Ca^{2+}]_m$ were detected respectively using the Fluo-4-AM green dye, the Fluo-4FF AM green dye and the Rhod-2 AM red dye according to the manufacturer's guidelines. After a 4 h-exposure with NiONPs, cells were incubated with different probes in PSS and co-incubated with Hoechst 33342. The plates were observed at $\times 200$ magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). The fluorescence intensity was measured for Rhod-2 at 543/605 nm, for Fluo-4-AM and Fluo-4FF at 488/515 nm and for Hoechst at 408/450 nm (excitation/emission). For each experiment 20 at 30 cells were analysed per well. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

2.8. Mitochondrial activity

Cells were exposed to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 4 h.

2.8.1. Mitochondrial membrane potential measurement

The mitochondrial membrane potential (Ψ_{MP}) was measured using confocal microscopy (TE 2000, Nikon) by TMRM red dye (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate) (ThermoFischer®) according to the manufacturer's guidelines. After a 4 h-exposure with NiONPs cells were incubated with TMRM probe in PSS co-incubated with Hoechst 33342. The plates were observed at $\times 200$ magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured at 543/605 nm (excitation/emission). The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

2.8.2. Mitochondrial mass

The mitochondrial mass was measured using confocal microscopy by Mitotracker green dye (ThermoFischer®) according to the manufacturer's guidelines. After a 4 h - exposure with NiONPs cells were incubated with Mitotracker probe in PSS co-incubated with Hoechst 33342. The fluorescence intensity was measured at 408/450 nm (excitation/emission). The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.9. Apoptosis induction

The apoptosis was measured using confocal microscopy (TE 2000, Nikon) by caspase 9 green dye (ImmunoChemistry Technologies®) according to the manufacturer's guidelines. After a 24 h-exposure with NiONPs, cells were incubated with caspase 9 fluorescent probe in PSS co-incubated with Hoechst 33342. The plates were observed at $\times 200$

magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). The fluorescence intensity was measured at 488/515 nm (excitation/emission). The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

2.10. Gene expression

A real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed to evaluate mRNA expression of *cav2*, *cltb*, *sod_{Zn/Cu}*, *cat*, *mt*, *cox1*, *atp6-8*, *acc* and *bax* (details on SI2). Cells were exposed to NiONPs for 24 h then, mRNA extraction and purification were performed using a commercially available kit (SV Total RNA Isolation System, Promega), according to the manufacturer's recommendations and as previously described by (Pierron et al., 2009). The elongation factor-1 α (*ef1- α*), ribosomal protein L7 (*rpl7*) and β -actin (*β -act*) genes were used as internal controls. The relative quantification of each gene expression level was normalized against the mean housekeeping genes *ef1 α* , *β -act* and *rpl7*, and changes in Ct values were recorded. From this comparison, fold-change factors were obtained according to $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The primer sequences used are described in SI2.

2.11. Statistical analysis

Each experimental condition was independently repeated several times (n indicates the number of experiments) and for each independent experiment, 3 to 8 wells per condition were assessed. Data are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM) for n independent experiments. Assumptions necessary for using the parametric test were checked (normality, independence and homoscedasticity of the error term). Statistical analyses were performed using either one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons (n > 30), or Kruskal Wallis test followed by Dunn's post-test (n < 30). (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001). All data were analysed using GraphPad statistics software. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

After internalization, NiONPs were mainly clustered in vesicles in the cytoplasm (Fig. 1B), compared to their absence in controls (Fig. 1A). Internalized NPs were mostly organized in aggregates of various sizes. Single or isolated NPs were rarely observed. NiONPs were also localized near the nucleus and near the mitochondria. These results were confirmed by the qPCR assay which showed a significant increase of the expression of two membrane proteins involved in the internalization (i. e., caveolin-2 and clathrin-b), (* P < 0.05) as compared to untreated cells (Fig. 1C and D). The WST-1 cytotoxic assay evaluated on HEPA-E1 after a 24-h treatment with NiONPs showed a significant and concentration – dependent decrease of cell viability from 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ as compared to untreated cells (Fig. 1E).

After a 4 h-exposure of HEPA-E1 to NiONPs we observed a significant and concentration-dependent decrease in intracellular global ROS production as compared to untreated cells (Fig. 2A). Nevertheless, a significant increase in intracellular and mitochondrial $O_2^{\cdot -}$ production as compared to untreated cells is observed (Fig. 2B and C). After a 24 h-exposure to NiONPs IL-6 secretion was observed from 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 2D). After a 24 h-exposure of HEPA-E1 to NiONPs a significant increase in *sod_{Cu/Zn}*, *cat* and *mt* expressions was observed at the highest concentration as compared to the untreated cells (Fig. 2E, F and 2G) but a significant decrease in SOD activity was observed at the three concentrations compared to the control (Fig. 2H).

After a 4 h-exposure of HEPA-E1 to NiONPs a significant concentration-dependent decrease of the basal cytoplasmic and ER calcium level as compared to untreated cells was observed (Fig. 3A and B). Nevertheless, the results showed a significant concentration-

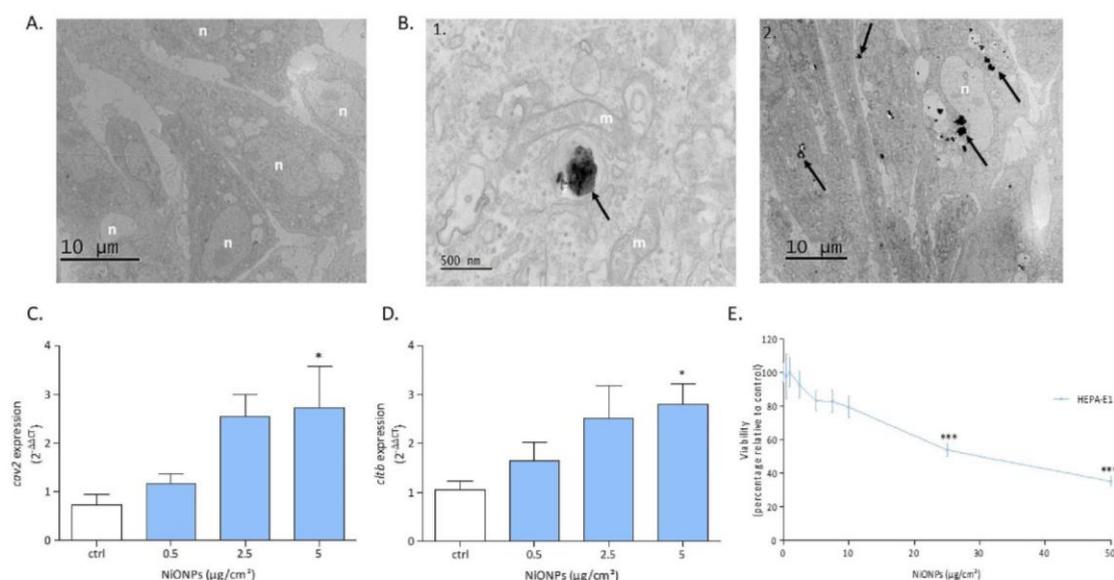


Fig. 1. (A) HEPA-E1 observed by TEM, control (X2500) and (B1 and 2) NiONPs (5 µg/cm²) (X30000). Black arrows show intracellular NiONPs aggregate, n: nucleus, m: mitochondria. (C) *cav2* mRNA expression and (D) *cltb* mRNA expression. Data were mean ± SEM of five independent experiments, n = 5 (three wells/concentration). (E) Cell viability after a 24 h-exposure with NiONPs (1–50 µg/cm²). Results are expressed as the percentage of cell viability in treated cells, as compared to control cells (100%). Data are mean ± SEM of four independent experiments, n = 4 (eight wells/concentration). Statistically significant at P < 0.05(*), P < 0.01(**) and P < 0.001(***) as compared to untreated control cells.

dependent increase of the basal mitochondrial calcium level (Fig. 3C). A pre-treatment of 1-h with PEG-SOD and PEG-CAT, prior to a 4 h-exposure of HEPA-E1 to NiONPs didn't induce significant alteration in cytoplasmic or mitochondrial calcium levels compared to untreated cells but significantly decreased the ER calcium level at the highest concentration 5 µg/cm². These results indicate that ROS production is involved in Ca²⁺ signalling impairment. As compared to controls, after a 4 h-exposure of HEPA-E1 to NiONPs, the Ψ MP significantly decreased from 0.5 µg/cm² as compared to untreated cells (Fig. 3D), effect reversed by a pre-treatment of 1-h with PEG-SOD and PEG-CAT. The mitochondrial mass significantly increased from 2.5 µg/cm² (Fig. 3E).

Finally after 24-h exposure, qPCR results showed a significant increase of mitochondrial metabolism genes expression for *cox1*, *atp6-8* and *acc* as compared to control cells at 5 µg/cm² (Fig. 4A, B and 4C) and a significant concentration-dependent increase of apoptotic cells with a caspase 9 increased (Fig. 4D), confirmed by a significant increase of *bax* mRNA expression in HEPA-E1 with NiONPs (Fig. 4E).

4. Discussion

In New Caledonia among species affected by Ni mining activities, Pacific eels such as marbled eels, *Anguilla marmorata*, are endemic fishes known to be particularly sensitive to water metal contamination (Duriu et al., 2005). The liver is the main organ for lipids metabolism, essential for growth, migration and reproduction of eels, but liver is also the main site of metal bioaccumulation. So, it appears important to study the mechanisms of NiONPs toxicity on eel hepatocytes, which to our knowledge has never described despite only a few *in vitro* studies that investigated the direct effect of some metal NPs on fishes hepatocytes but the NiONPs toxicity on eel hepatocytes remains unknown. Note that our study had to be done with another species of Pacific eel, *Anguilla japonica*, the only existing hepatocyte cell line from eel nowadays, however the two species are genetically and geographically very close (Arai et al., 2002; Kuroki et al., 2009; Chen et al., 2018).

It is well-known that oxidative stress and calcium signalling have a key role in hepatocyte regulation, and that the calcium homeostasis

alteration may be involved in liver dysfunctions (Amaya and Nathanson, 2013; Madreiter-Sokolowski et al., 2020). Indeed, *in vitro* studies using primary hepatocytes from *Epinephelus coioides* or *Oncorhynchus mykiss*, have demonstrated the cytotoxicity of metallic NPs leading to cytotoxicity and to ROS production generation (Massarsky et al., 2014; Wang et al., 2016). However, the underlying cellular and molecular mechanisms involving the oxidative stress and mitochondrial dysfunction remain unclear.

When HEPA-E1 were exposed to NiONPs, these particles were internalized into cells, confirmed by the interaction with the membrane proteins involved in internalization (*cav2* and *cltb*). Similar to other metallic NPs, the internalization of NiONPs appears to be a key factor for their toxicity (Munoz and Costa, 2012). The NiONPs cytotoxicity in HEPA-E1 was evaluated to select the concentrations (mortality rate <20%) used for further mechanistic experiments. Interestingly, the concentrations ranged from 0.5 to 5 µg/cm², reflecting the nickel concentrations in freshwater downstream mines in New Caledonia and are realistic concentrations close to the ones found from NiONPs exposure (AEL, ValeNC 2013; Soproner, SLN, 2013). Another important mechanism leading to metal oxide NPs cytotoxicity, is probably an over-production of ROS (Ivask et al., 2015), due to the ion reactivity. In fact, NiONPs generate dissolved Ni in the HEPA-E1 culture medium. Moreover, Ni is proposed to cycle between Ni²⁺ and Ni³⁺, catalysing the reduction of H₂O₂ leading to free radical generation like hydroxyl radical (OH[•]) and O₂^{•-} (Torreilles and Guerin, 1990). Our present study demonstrates that in HEPA-E1, NiONPs decreased the global ROS production and increased both cytoplasmic and mitochondrial O₂^{•-}. The fluorimetric method used to assess global ROS production is a powerful assay, easy to carry out, and it can detect different ROS like H₂O₂, however, this assay does not allow for determining free radicals like O₂^{•-} due to their very short half-life (Wang and Joseph, 1999; Oparka et al., 2016). Therefore, we hypothesized that NiONPs might decrease H₂O₂ production. As regards as the antioxidant enzymes after ROS over-production, the antioxidant system induced the production of antioxidant enzymes to maintain the redox balance (Sies et al., 2017). However, some authors have shown a decrease in antioxidant enzyme

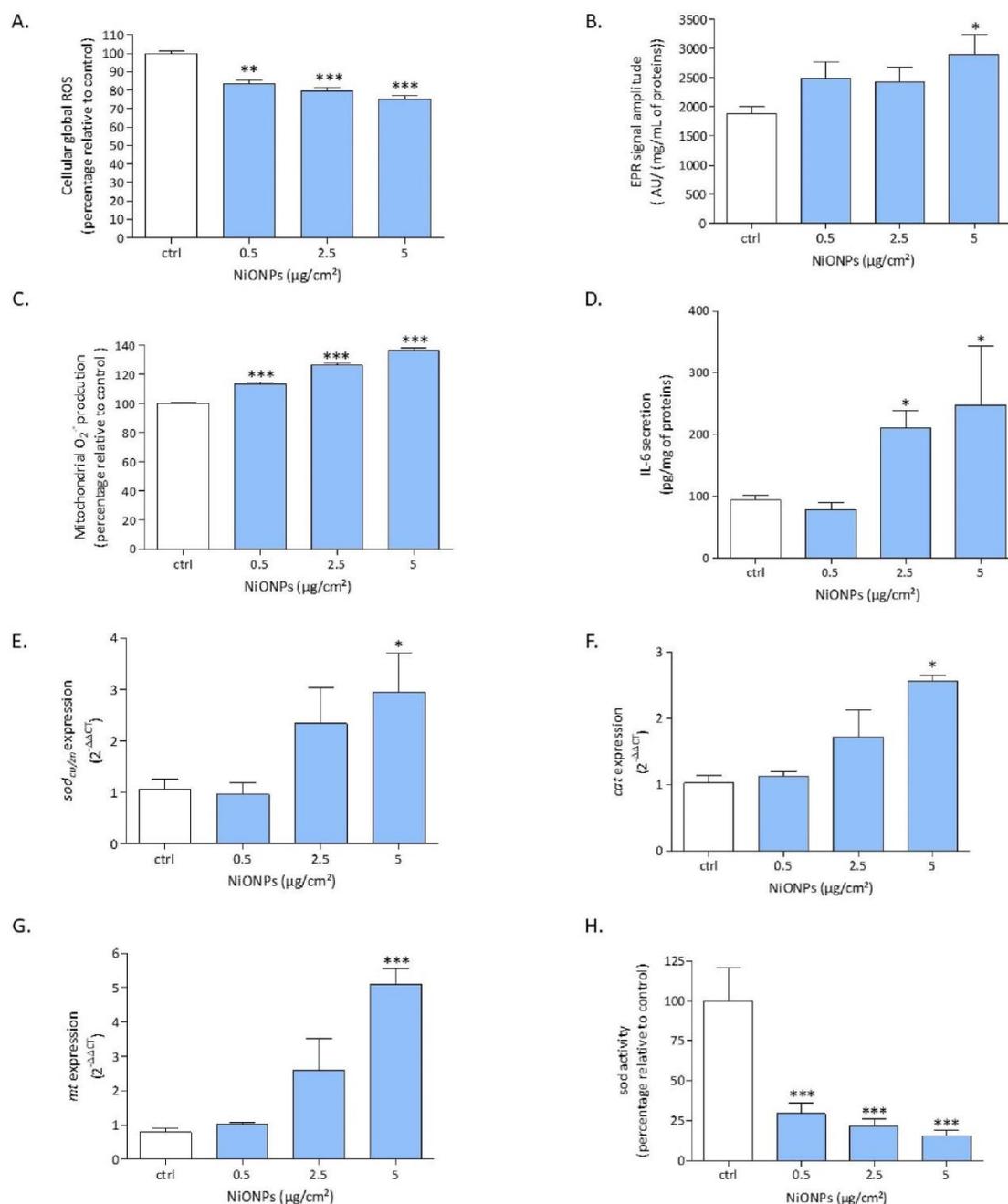


Fig. 2. (A) Global ROS production after 4 h-exposure with NiONPs (percentage of ROS production relative to control 100%, mean \pm SEM of four independent experiments, $n = 4$ (three wells/concentration)). (B) Intracellular O₂⁻ production after 4 h-exposure with NiONPs (EPR signal amplitude in arbitrary units (AU)/mg/mL of proteins). (C) Mitochondrial O₂⁻ production after 4 h-exposure with NiONPs (percentage of MitoSOX probe fluorescence intensity relative to control cells 100%). (D) IL-6 secretion after 24 h-exposure with NiONPs (pg/mg of proteins, mean \pm SEM of six independent experiments, $n = 6$ (three wells/concentration)). (E) *sod_{cu/zn}* mRNA expression (F) *cat* mRNA expression (G) *mt* mRNA expression (mean \pm SEM of five independent experiments, $n = 5$ (three wells/concentration)). (H) SOD activity in HEPA-E1 after NiONPs-exposure (values normalized to the untreated cells and expressed as the SOD activity inhibition rate relative to the control cells, mean \pm SEM of three independent experiments, $n = 3$ (three wells/concentration)). Statistically significant at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***), as compared to untreated control cells.

activity, like *sod* and *cat*, in liver tissue of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) after TiO₂NPs exposure (Hao et al., 2009), that could be explained by a direct interaction between NPs and antioxidant enzymes, which undergoes a functional change (Zhang et al., 2019). In our study, similar

results were observed with an increase in *sod_{cu/zn}* and *cat* transcriptions and a decrease in SOD activity. The NiONPs seemed then to interact with SOD at the post-transcriptional level by inhibiting its activity. This decrease of activity may have explained the NiONPs-induced O₂⁻

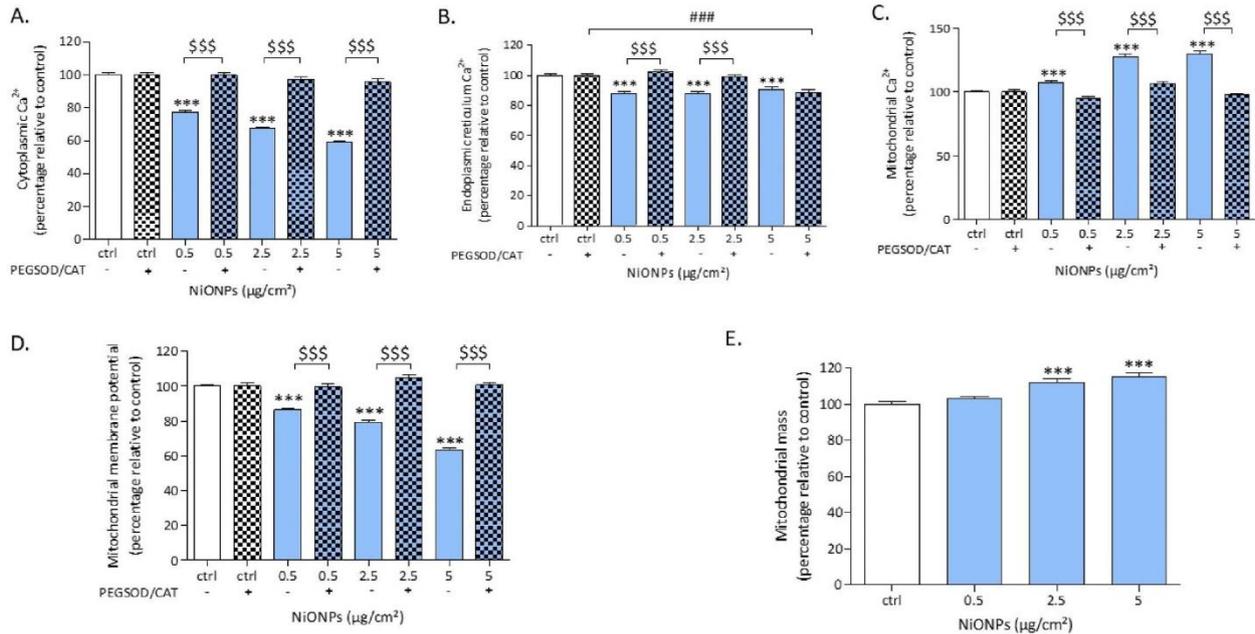


Fig. 3. Cytoplasmic ([Ca²⁺]_i), ER ([Ca²⁺]_{ER}), mitochondrial calcium ([Ca²⁺]_m), ΨMP and mitochondrial mass. Cells are treated or not with antioxidant enzymes (PEGSOD/CAT) 1 h before 4 h-exposure with NiONPs. Results are expressed as the percentage of the probes fluorescence intensity relative to the control cells (100%). (A) [Ca²⁺]_i (B) [Ca²⁺]_{ER} (C) [Ca²⁺]_m. (D) ΨMP (E) Mitochondrial mass. Data are mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (six wells/concentration). Statistically significant at P < 0.05(*) and P < 0.001(***) as compared to untreated cells, statistically significant at P < 0.001(\$\$\$), as compared to cells pre-treated with antioxidant enzymes.

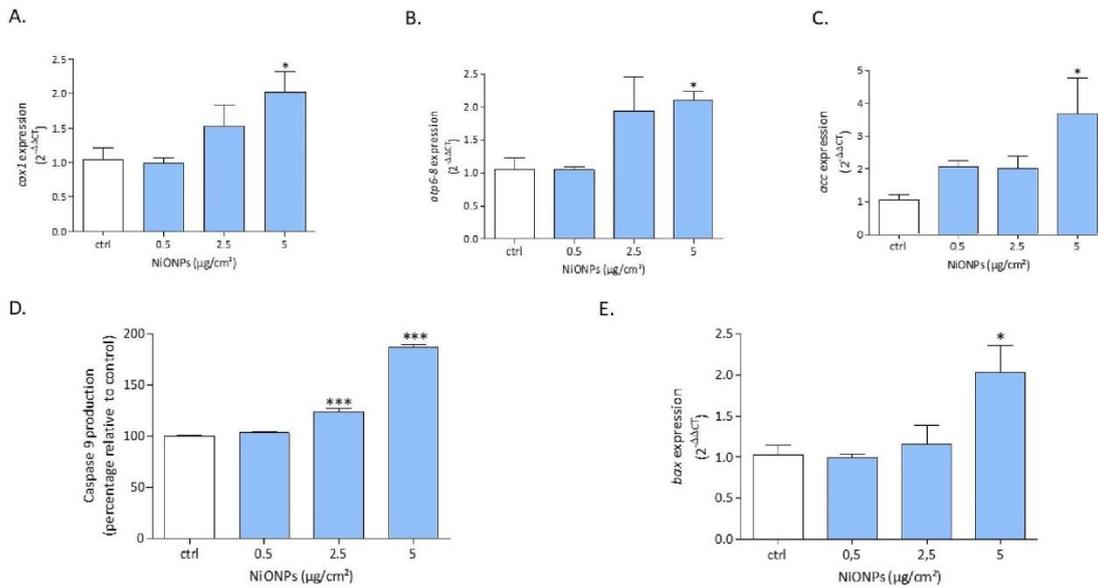


Fig. 4. Cells were exposed 24 h with NiONPs (0.5–5 µg/cm²). qPCR results are expressed as the fold change of gene mRNA expression relative to the control cells (mean ± SEM of five independent experiments, n = 5 (three wells/concentration)). (A) cox1 mRNA expression (B) atp6-8 mRNA expression (C) acc mRNA expression. (D) Caspase 9 production (percentage of the caspase 9 probe fluorescence intensity relative to control 100%). (E) bax mRNA expression. Statistically significant at P < 0.05 (*), P < 0.01(**) and P < 0.001(***) as compared to untreated control cells.

production in HEPA-E1, and suggested that the generated O₂^{•-} is not or less dismutated in H₂O₂ by the SOD. The O₂^{•-} is therefore permanently overproduced without being detoxified, leading to a decrease in H₂O₂ production. Our observation showed good agreement with previous

published data on human hepatocytes after carbon and copper oxide NPs exposure (Adeyemi et al., 2020). However, detoxification proteins such as metallothionein appear to be activated, probably in response to dissolved nickel release.

It has been demonstrated that ROS generated by metallic oxide NPs might activate the inflammatory pathways via the secretion of cytokines (Zhang et al., 2012) like IL-6, an important cytokine to control the immune systems in fish. The IL-6 expression in eel has already been described (Castellana et al., 2008; Birhanu et al., 2016; Zhu et al., 2016). Our results are in accordance with those previous studies, with a pro-inflammatory response characterized by an increase in IL-6 secretion after NiONPs exposure, which may induce impairment of liver function.

Oxidative stress is also known to play a key role in the physiopathology of liver diseases by altering the calcium homeostasis and the mitochondrial function in hepatocytes (Gordeeva et al., 2003; Madrieter-Sokolowski et al., 2020). Our study shows that the alteration of calcium homeostasis may originate from oxidative stress. Indeed, the $[Ca^{2+}]$ alterations were reduced by a pre-treatment with antioxidant enzymes and such pre-treatment fully restored calcium homeostasis. Due to decrease of basal cytoplasmic and ER calcium levels and the increase of basal mitochondrial calcium level, we hypothesize that the mitochondria can pumping calcium from the cytoplasm and ER, as previously observed in some liver dysfunctions (Amaya and Nathanson, 2013). Some authors have also suggested the important role of calcium homeostasis in hepatic regulation in eels (Fabbri et al., 1998). This excess of calcium could then activate the mitochondrial biogenesis, confirmed by the increase in mitochondrial enzyme transcription *atp6-8* and mitochondrial mass in our study. Nevertheless, the increase in *cox1* shows an alteration of the mitochondrial respiratory chain probably in connection with altered mitochondria activity as suggested by the decrease of ΨMP maintained over the time (results after 24 h-exposure with NiONPs are not shown). It is well known that ROS, like $O_2^{\cdot-}$, can induce a peroxidation of mitochondrial membrane lipids, leading to a ΨMP impairment (Cadenas and Davies, 2000). This later mechanism was confirmed in our current study because of the unchanged ΨMP as compared to control cells when cells are pretreated with antioxidant enzymes. All these alterations can then dysregulate the lipid metabolism (Kroemer et al., 2007; Prakash et al., 2017). The modification of ΨMP could activate mechanism of cell death like apoptosis to offset the production of altered mitochondria (Kroemer et al., 2007). Indeed, apoptosis after NiONPs exposure is observed with an increase of pro-apoptotic factor transcription *bax* and caspase 9 production.

Overall, our results show that NiONPs alter the expression of many genes involved in different functions that demonstrating the toxic potential of these NPs. The integration of transcriptomic method in our study provides strong evidence of molecular and potentially functional alterations in fish livers. Our results demonstrate with different approaches, that the main mechanism of cell death after NiONPs exposure involves apoptosis via mitochondria alteration, that might contribute to liver dysfunction leading to faulty lipid metabolism. NiONPs exposure might contribute to alter the quality of migration and maturation of eel and potentially their reproduction.

5. Conclusion

The current study describes the mechanisms of action of NiONPs on eel hepatocytes. Indeed, NiONPs induce an intracellular ROS overproduction in HEPA-E1, then leading to a pro-inflammatory response and a $[Ca^{2+}]$ rise. Disruption of intracellular calcium homeostasis might be explained by oxidative stress. In addition, NiONPs trigger a liver toxicity through the induction of mitochondrial dysfunction characterized by mitochondrial ROS generation, ΨMP collapse and mitochondrial Ca^{2+} overload. Furthermore, we have demonstrated an apoptosis of hepatocytes, NiONPs-induced as a consequence of these toxic effects.

This study also suggests that marbled eels living in mining-influenced freshwaters could decline in population due to the high liver toxicity caused by Ni particles emitted by mining activities in New Caledonia. Indeed, owing to the fact that liver is known to play a major role in lipid metabolism and by consequence in the success of

reproduction of eels, exposure of *Anguilla marmorata* to NiONPs and in a broader extend of freshwater organisms leaving in these rivers, may put them at risk to reproduce and then could impact all the aquatic ecosystem.

Statement of contributions

Germande Ophélie : Conceptualization, Formal Analysis, Methodology, Visualization, Writing – original draft.

Beaufils Fabien : Methodology, Writing – review & editing.

Daffe Guillemine : Methodology, Writing – review & editing.

Gonzalez Patrice : Methodology, Writing – review & editing.

Mornet Stéphane : Resources, Methodology, Writing – review & editing.

Bejko Megi : Resources, Formal Analysis, Writing – review & editing.

Errera Marie-Hélène : Writing – review & editing.

Lacomme Sabrina : Resources, Writing – review & editing.

Gontier Etienne : Resources, Writing – review & editing.

Guibert Christelle : Writing – review & editing.

Baudrimont Isabelle : Project administration, Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Baudrimont Magalie : Project administration, Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We want to acknowledge Dr Bénédicte Morin and Pr Jérôme Cachot for providing the eels hepatocytes strain HEPA-E1, and Pr Peggy Gunkel-Grillon and Dr Yannick Dominique for the opportunity to work on the impacts of nickel open pit mining activity in New Caledonia. This work was supported by a PhD funding from the University of Bordeaux for Ophélie Germande, and all the facilities and financial supports from EPOC and CRCTB.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135158>.

References

- Adeyemi, J.A., Machado, A.R.T., Ogunjimi, A.T., Alberici, L.C., Antunes, L.M.G., Barbosa, F., 2020. Cytotoxicity, mutagenicity, oxidative stress and mitochondrial impairment in human hepatoma (HepG2) cells exposed to copper oxide, copper-iron oxide and carbon nanoparticles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189.
- Amaya, M.J., Nathanson, M.H., 2013. Calcium signaling in the liver. *Compr. Physiol.* 3, 515–539.
- Ambatsian, P., Fernex, F., Bernat, M., Parron, C., Lecolle, J., 1997. High metal inputs to closed seas: the New Caledonian lagoon. *J. Geochem. Explor.* 59, 59–74.
- Arai, T., Marui, M., Miller, M.J., Tsukamoto, K., 2002. Growth history and inshore migration of the tropical eel, *Anguilla marmorata*, in the Pacific. *Mar. Biol.* 140, 309–316.
- Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgul, G., Guney, E., Inouye, K., Hotamisligil, G.S., 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* 20, 1427–1435.
- Ashraf, M.A., Maah, M.J., Yusoff, I., 2011. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8, 401–416.
- Barak, N.A., Mason, C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead in eels and roach: the effects of size, season and locality on metal concentrations in flesh and liver. *Sci. Total Environ.* 92, 249–256.
- Bermejo-Nogales, A., Fernandez, M., Fernandez-Cruz, M.L., Navas, J.M., 2016. Effects of a silver nanomaterial on cellular organelles and time course of oxidative stress in a fish cell line (PLHC-1). *Comp. Biochem. Physiol. C* 190, 54–65.

- Birhanu, B.T., Lee, J.S., Lee, S.J., Choi, S.H., Hossain, M.A., Park, J.Y., Kim, J.C., Suh, J.W., Park, S.C., 2016. Immunomodulation of *Lactobacillus pentosus* PL11 against *Edwardsiella tarda* infection in the head kidney cells of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Shellfish Immunol.* 54, 466–472.
- Boetius, I., Boetius, J., 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1.
- Bonnet, X., Briand, M.J., Brischoux, F., Letourneur, Y., Fauvel, T., Bustamante, P., 2014. Anguilliform fish reveal large scale contamination by mine trace elements in the coral reefs of New Caledonia. *Sci. Total Environ.* 470–471, 876–882.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. & Med.* 29, 222–230.
- Castellana, B., Iliev, D.B., Sepulcre, M.P., MacKenzie, S., Goetz, F.W., Mulero, V., Planas, J.V., 2008. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Immunol.* 45, 3363–3370.
- Chen, S.C., Chang, C.R., Han, Y.S., 2018. Seaward migration routes of indigenous eels, *Anguilla japonica*, *A. marmorata*, and *A. bicolor pacifica*, via satellite tags. *Zool. Stud.* 57, e21.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y., 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* 44, 587–604.
- Deweirdt, J., Quignard, J.F., Crobeddu, B., Baeza-Squiban, A., Sciare, J., Courtois, A., Lacomme, S., Gontier, E., Muller, B., Savineau, J.P., Marthan, R., Guibert, C., Baudrimont, L., 2017. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol. Vitro: Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 45, 340–350.
- Di Bucchianico, S., Gliga, A.R., Akerlund, E., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H.L., 2018. Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* 15, 32.
- Durieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., Rochard, E., Boudou, A., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28, 581–591.
- Fabbi, E., Barbin, L., Capuzzo, A., Biondi, C., 1998. Adenyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Am. J. Physiol.* 275, R1563–R1570.
- Germande, O., Baudrimont, M., Beauflis, F., Freund-Michel, V., Ducret, T., Quignard, J.F., Errera, M.H., Lacomme, S., Gontier, E., Mornet, S., Bejko, M., Muller, B., Marthan, R., Guibert, C., Deweirdt, J., Baudrimont, L., 2022. NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption. *Nanotoxicology* 1–23.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biomaterials: Int. J. Role Metal Ions Biol. Chem. Med.* 19, 225–235.
- Gordeeva, A.V., Zvyagilskaya, R.A., Labas, Y.A., 2003. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry. Biokhimiia* 68, 1077–1080.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol.* 6, 260–271.
- Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Bazire, N., 2014. Toxic chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia. *Environ. Chem. Lett.* 12, 511–516.
- Hao, L., Wang, Z., Xing, B., 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci. (China)* 21, 1459–1466.
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140.
- Hedouin, L., Pringault, O., Metian, M., Bustamante, P., Warnau, M., 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. *Chemosphere* 66, 1449–1457.
- Imran Din, M., Rani, A., 2016. Recent advances in the synthesis and stabilization of nickel and nickel oxide nanoparticles: a green adeptness. *Int. J. Anal. Chem.* 2016, 3512145.
- Isnard, S., L'huillier, L., Rigault, F., Jaffré, T., 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* 403, 53–76.
- Ivask, A., Titma, T., Visnapuu, M., Vija, H., Käkinen, A., Sihtmae, M., Pokhrel, S., Madler, L., Heinlaan, M., Kisand, V., Shimmo, R., Kahru, A., 2015. Toxicity of 11 metal oxide nanoparticles to three mammalian cell types in vitro. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 1914–1929.
- Javed, M., Usmani, N., 2013. Assessment of heavy metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) pollution in effluent dominated rivulet water and their effect on glycogen metabolism and histology of *Mastacembelus armatus*. *SpringerPlus* 2.
- Kettle, C.J., Hollingsworth, P.M., Jaffre, T., Moran, B., Ennos, R.A., 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Mol. Ecol.* 16, 3581–3591.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.
- Kunjiappan, S., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R., 2015. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of *Azolla microphylla* phytochemically synthesized gold nanoparticles on acetaminophen - induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 51, 630–643.
- Kuroki, M., Aoyama, J., Miller, M.J., Yoshinaga, T., Shinoda, A., Hagihara, S., Tsukamoto, K., 2009. Sympatric spawning of *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica* in the western North Pacific Ocean. *J. Fish. Biol.* 74, 1853–1865.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., 1990. Fat content as a factor inducing migratory behaviour in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften* 77, 488–490.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Losfeld, G., L'Huillier, L., Fogliani, B., Jaffre, T., Grison, C., 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5592–5607.
- Madreiter-Sokolowski, C.T., Thomas, C., Ristow, M., 2020. Interrelation between ROS and Ca²⁺ in aging and age-related diseases. *Redox Biol.* 36, 101678.
- Massarsky, A., Abraham, R., Nguyen, K.C., Rippstein, P., Tayabali, A.F., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2014. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes (vol 159, pg 10, 2014). *Comp. Biochem. Physiol. C* 162, 15–15.
- Migon, C., Ouilon, S., Mari, X., Nicolas, E., 2007. Geochemical and hydrodynamic constraints on the distribution of trace metal concentrations in the lagoon of Noumea, New Caledonia. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 74, 756–765.
- Munoz, A., Costa, M., 2012. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 1–16.
- Nouri, J., Karbassi, A.R., Mirkia, S., 2008. Environmental management of coastal regions in the Caspian Sea. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 43–52.
- Oparka, M., Walczak, J., Malinska, D., van Oppen, L., Szczepanowska, J., Koopman, W.J.H., Wiekowski, M.R., 2016. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods* 109, 3–11.
- Ostaszewska, T., Sliwinski, J., Kamaszewski, M., Sysa, P., Chojnacki, M., 2018. Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 908–915.
- Pasquet, C., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Serres, A., Quiniot, T., Rocca, F., Monna, F., Losno, R., van Oort, F., Chateau, C., 2016. Alternative dry separation of PM10 from soils for characterization by kinetic extraction: example of new Caledonian mining soils. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 25105–25113.
- Pasquet, C., Monna, F., van Oort, F., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Losno, R., Chateau, C., 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* 190, 638.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.P., Brethes, D., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81, 304–311.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloch, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C., 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4607–4612.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620–631.
- Prakash, Y.S., Pabelick, C.M., Sieck, G.C., 2017. Mitochondrial dysfunction in airway disease. *Chest* 152, 618–626.
- Rieusset, J., 2017. Endoplasmic reticulum-mitochondria calcium signaling in hepatic metabolic diseases. *Bba-Mol. Cell. Res.* 1864, 865–876.
- ScaleAir.**
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748.
- Singh, A.N., Zeng, D.H., Chen, F.S., 2005. Heavy metal concentrations in redeveloping soil of mine spoil under plantations of certain native woody species in dry tropical environment, India. *J. Environ. Sci. (China)* 17, 168–174.
- Torreilles, J., Guerin, M.C., 1990. Nickel(II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation. *FEBS Lett.* 272, 58–60.
- Turan, F., Karan, S., Ergenler, A., 2020. Effect of heavy metals on toxicogenetic damage of European eels *Anguilla anguilla*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 38047–38055.
- Usero, J., Izquierdo, C., Morillo, J., Gracia, L., 2004. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environ. Int.* 29, 949–956.
- van der Oost, R., J. B., N., V.P., 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Ginneken, V., Maes, G., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 367–398.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. & Med.* 27, 612–616.
- Wang, T., Chen, X., Long, X., Liu, Z., Yan, S., 2016. Copper nanoparticles and copper sulphate induced cytotoxicity in hepatocyte primary cultures of *Epinephelus coioides*. *PLoS One* 11, e0149484.
- Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D., Biswas, P., 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4336–4345.
- Zhang, H., Ji, Z., Xia, T., Meng, H., Low-Kam, C., Liu, R., Pokhrel, S., Lin, S., Wang, X., Liao, Y.P., Wang, M., Li, L., Rallo, R., Damoiseaux, R., Telesca, D., Madler, L., Cohen, Y., Zink, J.L., Nel, A.E., 2012. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano* 6, 4349–4368.
- Zhang, R., Jia, C., Zhao, L., Pan, J., Niu, Q., Liu, R., 2019. Characterization of the interaction between carbon black and three important antioxidant proteins using multi spectroscopy and modeling simulations. *Chemosphere* 222, 823–830.
- Zhu, Q., Li, C., Yu, Z.X., Zou, P.F., Meng, Q.X., Yao, C.L., 2016. Molecular and immune response characterizations of IL-6 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish Shellfish Immunol.* 50, 263–273.

SI1. (A) Size distribution of NiONPs (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (B) Dissolved and particulate nickel in L15M. (C) Zeta potential versus pH of NiONPs

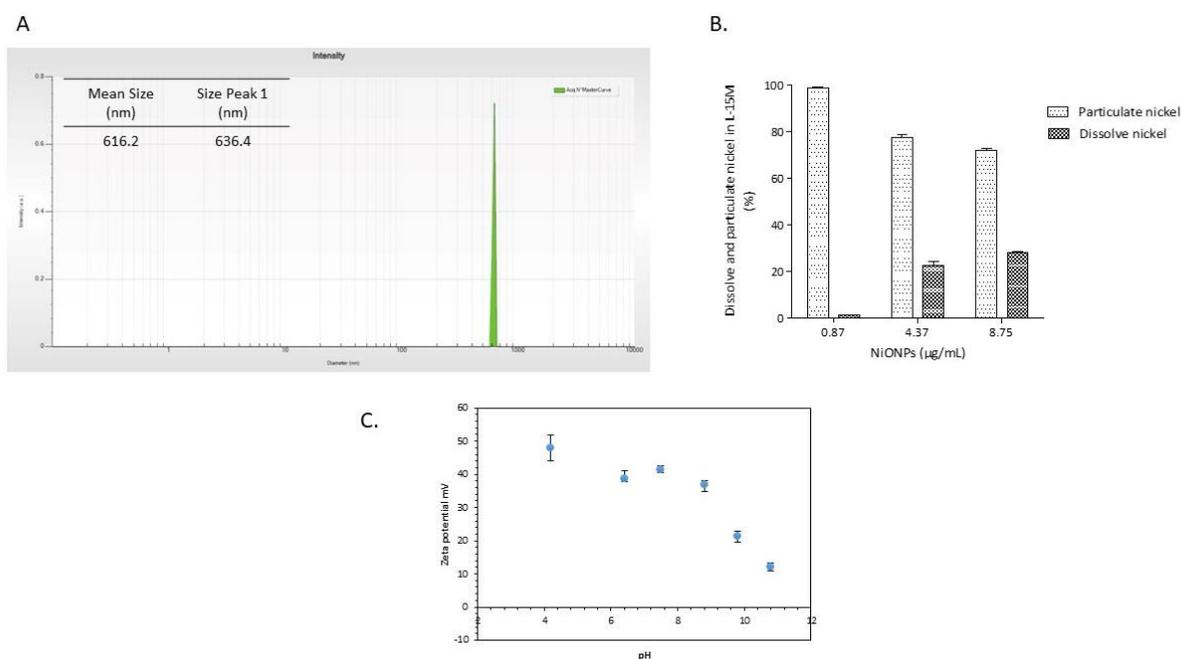
Materials and methods

Hydrodynamic size distributions and zeta potential

The hydrodynamic size distribution of NiONPs dispersed in L15M was determined at a concentration of 9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by Dynamic Light Scattering (DLS) using a VASCO particle size analyser from Cordouan Technologies®, as previously described (Germande et al., 2022)¹. Zeta potential values of NiONPs were measured by laser Doppler electrophoresis using a Wallis zeta potential analyser from Cordouan. NiONPs dispersion were dispersed at 0.2 g/L in 1 mQ water. In order to check the influence of serum protein and other components of the cell growth medium, which can be adsorbed on their surface, NiONPs were incubated 5 min (0.2 mg/mL) in L15M then centrifuged and redispersed in 1 mM HEPES at pH 7.4.

NiONPs dissolve determination

The dissolved nickel of NiONPs in L15M was determined. Samples were prepared in L15M at three different concentrations of NiONPs (0.87, 4.37 and 8.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in three replicates, in Amicon Ultra centrifugal filters, Ultracel 3K, regenerated cellulose, 3 000 NMWL (Merck® Millipore). Samples were centrifuged and 1 % HNO_3 was added.



Results

DLS was implemented to assess the colloidal stability state of NiONPs in the culture medium. The results at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ showed a peak detected around 616.2 indicating the flocculation state of NiONPs of 50 nm unit size (fig. SI1.A). The percentage of dissolved Ni in L15M medium ranges from 1.33 % for the lowest concentration (0.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to 22.69 and 28.03 % respectively for 4.37 and 8.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fig. SI1.B). In the figure SI1.C, we observe that NiONPs display positive zeta potential values from pH 4 to

11 with a decrease in alkaline media for which zero point of charge around pH 11 has already been observed. For physiological pH value (*ie* 7.4) NiONPs are positively charged with a quite high potential value of around +40 mV. The value of the zeta potential after incubation in L15M medium is radically modified, becoming negative (-30.46) that may be due to a protein corona formation mainly driven by electrostatic interaction on the NPs surface. After a second wash with 1 mM HEPES buffer at pH 7.4, the absolute potential value slightly increased further (-39.8), which can be explained by a screening of counter ions that are displaced during the second wash and therefore, some proteins may be strongly adsorbed around the NiONPs.

SI.2. Sequences of specific primer pairs used in quantitative PCR analyses

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>ef1-α</i>	5'- GGCTGGTGGTGTAGGTGAGT -3'	5'- TAAGCGCTGACTTCCTTGGT -3'
<i>rpl7</i>	5'- CCATTTTAAATAAATGCAACACCA -3'	5'- GCCCAAGTCAACAGCTCGTA -3'
<i>β-actin</i>	5'- TGCCTGACATCAAGGAGAAG -3'	5'- CAGGACTCCATACCCAGGAA -3'
<i>cav2</i>	5'- GGCCATCCTCATTTCAGTTG -3'	5'- TTGTGATTCCAGCGGTACAA -3'
<i>cltb</i>	5'- TGTTGTGTGTGCAGACATGC -3'	5'- CTGAACTGTGTGGCTGCTGT -3'
<i>sod_{zn/cu}</i>	5'- GACAACACAAATGGCTGCAT -3'	5'- CGTGAGCATTCTGTCCTTGA -3'
<i>cat</i>	5'- CGGTCAGGAGAGCCAGTAAG -3'	5'- ATGAAGCCTCTCTCCCCATT -3'
<i>mt</i>	5'- GCTCTGCATGGATGACAAAA -3'	5'- CGAGCTGCTGTCAGTGAAGA -3'
<i>cox1</i>	5'- GCAATGATGGCTATCGGACT -3'	5'- CAAGCCCCGACTGTAAATA -3'
<i>atp6-8</i>	5'- ACCAATTCATAAGCCCCACA -3'	5'- CCCCACATTTAGTGGGAGA -3'
<i>acc</i>	5'- ATCGACATGTACGGACACCA -3'	5'- CAATGCAGAGTACGCGATGT -3'
<i>bax</i>	5'- GCGACCCTAACCACAAGAAG -3'	5'- GTCAAGCTCGTCTCCGATTT -3'

2.2.Effets des sels de nickel, NiCl₂, sur les HEPA-E1

Évaluation de la viabilité cellulaire

Le test d'évaluation de la cytotoxicité WST-1 réalisé sur les HEPA-E1 après un traitement de 24 heures avec les sels de nickel montre une diminution significative et concentration dépendante de la viabilité cellulaire à partir de 45 µg/mL (soit 27.3 µg/cm²), par rapport aux cellules non traitées (figure 45). Une diminution significative de la viabilité cellulaire est observée pour les NPs de NiO dès 20 µg/cm². La concentration inhibitrice calculée (CI50) est de 49 µg/mL (soit 29.74 µg/cm²) alors que pour les NPs de NiO la CI50 est de 20.66 µg/cm². Ces résultats suggèrent donc que les NPs de NiO semblent plus toxiques que les sels de nickel.

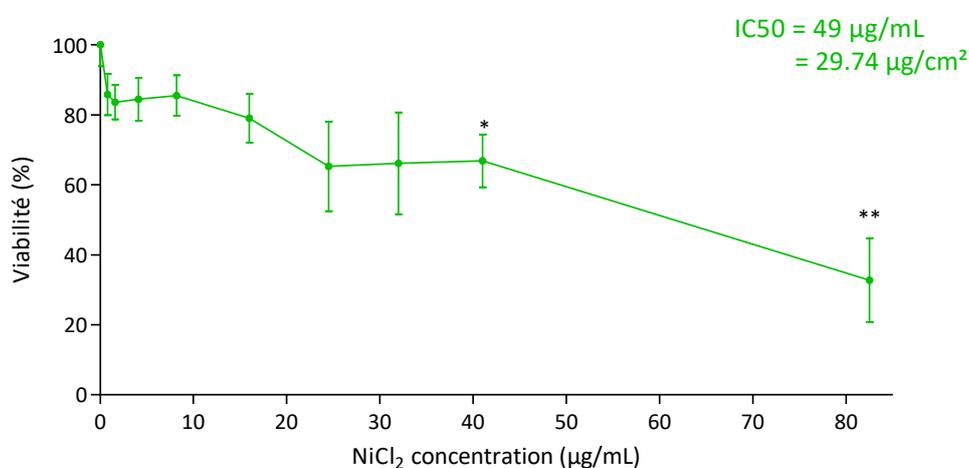


Figure 45 : Viabilité cellulaire après une exposition de 24 heures au NiCl₂ (0.5 – 80 µg/mL). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire dans les cellules traitées, par rapport aux cellules témoins (100 %). Les données sont la moyenne ± SEM de quatre expériences indépendantes, n = 4) (huit puits/concentration). Statistiquement significatif à P<0,05(*), et P<0,01(**) par rapport aux cellules témoins non traitées.

Évaluation de la production d'ERO

La production d'ERO globales dans les HEPA-E1 est évaluée après 4 h d'exposition avec le NiCl₂. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les cellules exposées et les cellules témoins (figure 46). A titre comparatif, après une exposition avec les NPs de NiO, une diminution significative de la production d'ERO est observée dès la plus faible concentration (0.5 µg/cm², soit 0.95 µg/mL). Les NPs de NiO semblent, ainsi, entraîner une augmentation de la production d'ERO globales plus importante que les sels de nickel.

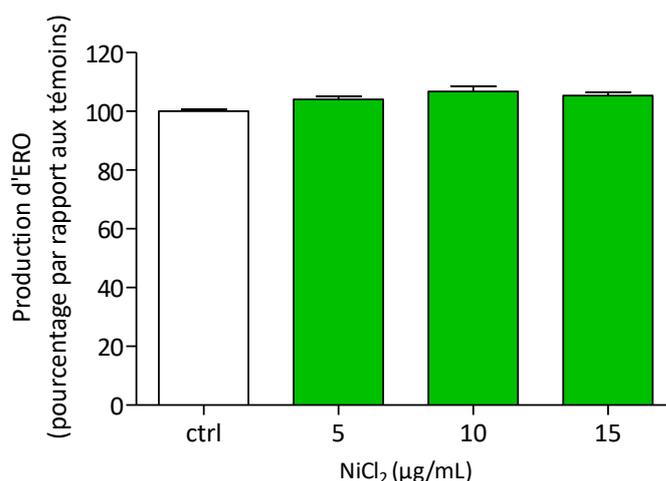


Figure 46 : Production d'ERO globales après 4h d'exposition au NiCl₂ (5 – 15 µg/mL). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins non traités. Les données sont la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, n = 3) (trois puits/concentration).

Évaluation de la réponse pro-inflammatoire

La réponse pro-inflammatoire est évaluée par la mesure de la sécrétion des IL-6. Les résultats ne montrent pas d'augmentation de la sécrétion de cette cytokine par rapport aux cellules témoins (figure 47). En comparaison, une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 par rapport aux témoins, dès 2.5 µg/cm² (soit 4.37 µg/mL) est observée après une exposition des HEPA-E1 avec les NPs de NiO. Ces résultats suggèrent donc que, dès de faibles concentrations, les NPs de NiO induisent une réponse pro-inflammatoire plus importante que les sels de nickel.

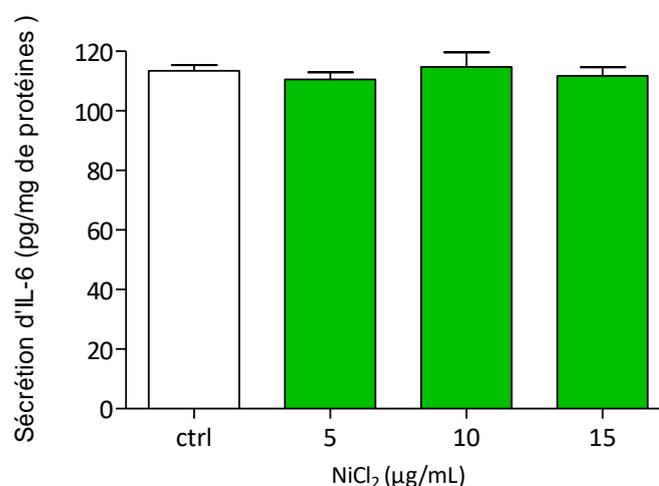


Figure 47 : Sécrétion d'IL-6 après 24h d'exposition au NiCl₂ (5 – 15 µg/mL). Les résultats sont exprimés en quantité d'IL-6 rapportées aux taux de protéines (pg/mg de protéines). Les données sont la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes, n = 3) (trois puits/concentration).

Résumé et conclusion:

A travers cette étude nous avons évalué les mécanismes à l'origine de la toxicité des NPs de NiO dans les hépatocytes d'anguille. Dans un premier temps, nous avons montré que les NPs de NiO sont internalisées dans les HEPA-E1, proches du noyau et des mitochondries. Ces phénomènes d'internalisation sont mis en évidence par MET ainsi que par l'augmentation de l'expression de *cav2* et *cltb*.

Nous avons, ensuite, déterminé le mécanisme par lequel les NPs de NiO génèrent un stress oxydant dans les HEPA-E1. Tout d'abord, il est observé, d'une part, une diminution des ERO globales, et, d'autre part, une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial et cytoplasmique. De plus, nous avons observé une baisse de l'activité de la SOD. Ces résultats semblent indiquer qu'il y a une production permanente d'espèces radicalaires tel que l' $O_2^{\cdot-}$ qui ne peut pas être dismuté en H_2O_2 par la SOD étant donné que cette enzyme est peu, voire pas active. Nous avons, également, montré que la SOD était altérée en post transcriptionnel dans la mesure où une augmentation de son expression est observée. Les expressions de la *cat* et des *mt* sont également augmentées en réponse à la libération de nickel sous forme dissoute à la plus forte concentration.

En réponse au stress oxydant généré, il a, également, été mis en évidence le déclenchement d'une réponse pro-inflammatoire caractérisée par une augmentation de la sécrétion d'IL-6.

En utilisant des enzymes anti-oxydantes, nous avons, ensuite, montré que le stress oxydant semble être à l'origine de la perturbation de l'homéostasie calcique et de la dysfonction mitochondriale observées. Nos résultats suggèrent aussi que les organites, RE et mitochondrie (deux sites tampons du calcium qui coopèrent pour réguler l'homéostasie calcique intracellulaire) repompent le calcium cytoplasmique. En réponse à ce phénomène, les mitochondries activent leur biogenèse mise en évidence par l'augmentation de la transcription de l'enzyme mitochondriale *atp6-8* ainsi que de la masse mitochondriale. L'augmentation de la transcription de *cox1* observée montre une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale probablement en lien avec une altération de l'activité des mitochondries caractérisée par une diminution du Ψ MP. Il semblerait, d'autre part, que cette modification du Ψ MP pourrait activer les voies de mort cellulaire par apoptose dans la mesure où nous avons observé une augmentation de la transcription du facteur pro-apoptotique *bax* et de la production de caspase 9. Nos résultats sur les NPs de NiO sont résumés sur la figure 48. Enfin, nous avons, également, montré que les NPs de NiO semblent, à priori, plus toxiques que les sels de nickel.

cav2 : cavéoline-2
 cltb : clathrine-b
 SOD : Superoxyde dismutase
 cat : catalase
 mt : méthallothionéines
 H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
 $O_2^{\cdot -}$: Anion superoxyde
 $[Ca^{2+}]_{ic}$: concentration calcique cytoplasmique
 $[Ca^{2+}]_{re}$: concentration calcique réticulaire
 $[Ca^{2+}]_m$: concentration calcique mitochondriale
 AcCoa : Acetyl Cao carboxylase
 Atp6-8 : Adenosine triphosphate 6-8
 Cox : cyclo-oxygénase
 ΨMP : potentiel de membrane mitochondriale
 CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
 Casp9 : caspase 9
 Bax : Bcl-2-associated X protein

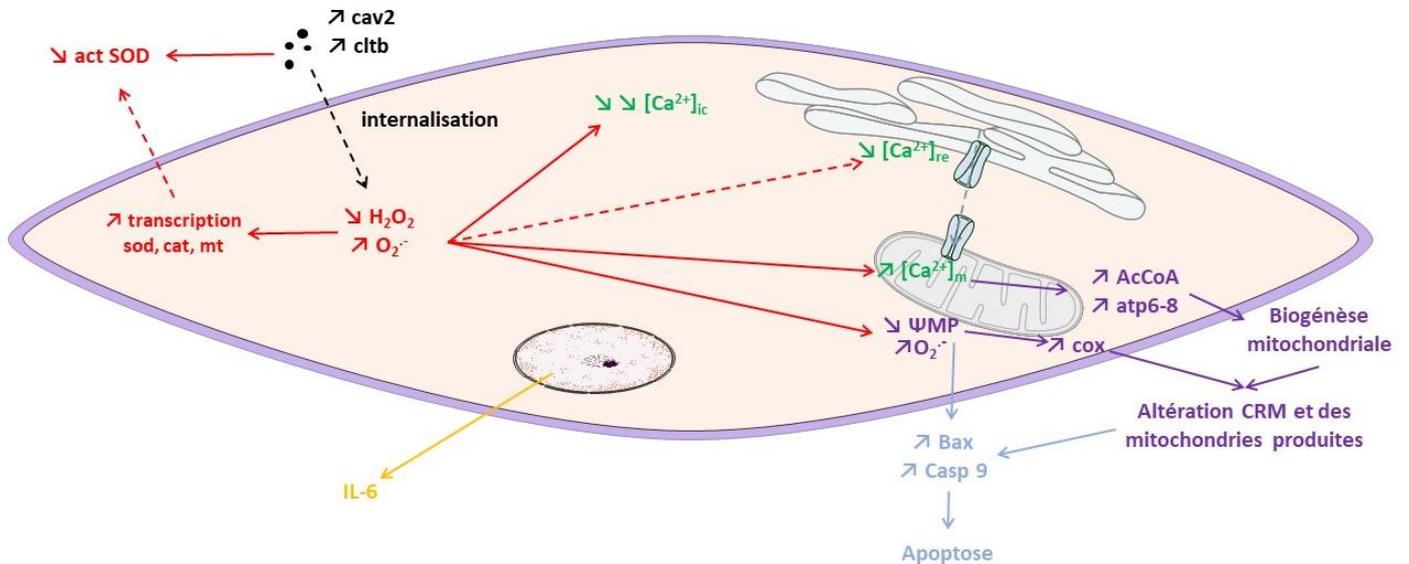


Figure 143 : Schéma résumé du mécanisme d'action toxique des NPs de NiO dans les cellules HEPA-E1

3. Cellules vasculaires pulmonaires humaines exposées aux latérites nickélifères : Effets cytotoxiques des particules fines de latérites riches en nickel, prélevées en Nouvelle-Calédonie, sur des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine impliquant le stress oxydant et la perturbation de la signalisation calcique

Contexte :

Après avoir élucidé le mécanisme d'action toxique des NPs de NiO, il nous est apparu opportun d'évaluer les mécanismes d'action toxique de particules (particulate matter, PM) naturelles directement prélevées en Nouvelle-Calédonie et de comparer leur toxicité à celle des NPs de NiO. Les particules atmosphériques (PUF, PM_{2.5}...) peuvent avoir diverses origines telles que l'émission directe dans l'atmosphère de particules provenant de l'industrie minière par exemple, ou la remise en suspension de particules à partir des sols, par le vent et les activités anthropiques. Cette dernière source est particulièrement importante sur des sols instables et fragiles, sensibles à l'érosion, comme les sols latéritiques riches en nickel en Nouvelle-Calédonie (Ambatsian et al., 1997, Losfeld et al., 2015) dont l'érosion naturelle conduit à l'émission atmosphérique de PM latéritiques. Les exploitations minières de nickel amplifient l'érosion des sols ultramafiques augmentant, ainsi, l'émission atmosphérique de PM (PM₁₀, PM_{2.5} et PUF) riches en métaux (He et al., 2005, Pasquet et al., 2018, Pasquet et al., 2016a). Ces phénomènes augmentent donc la probabilité pour les travailleurs et les populations environnantes d'inhaler ces particules. Dans la mesure où, d'une part, les cellules endothéliales constituent une cible privilégiée des effets nocifs des PM fines et ultrafines (PM_{2.5} et PUF) et, d'autre part, toute dysfonction endothéliale peut être à l'origine du déclenchement de pathologies cardiovasculaire telles que l'HTP, notre étude a porté sur des cellules HPAEC. La toxicité, notamment respiratoire, des PM_{2.5} et des PUF a, en partie, été étudiée, et il est rapporté qu'une exposition accrue à ces polluants déclenche des pathologies respiratoires comme l'asthme et la BPCO, mais également cardiovasculaires comme des infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle ou encore de l'HTP (Brown et al., 2002, Chaouat et al., 2009, Chalupa et al., 2004, Pope et al., 2015, Beelen et al., 2014, Pope et al., 2004, Pope et al., 2002). Les PM_{2.5} et les PUF sont souvent responsables d'un effet cytotoxique caractérisé par un stress oxydant important, une réponse pro-inflammatoire et une altération de la signalisation calcique, autant d'évènements à l'origine d'une altération de la réactivité vasculaire et d'une dysfonction endothéliale (Ying et al., 2013). Cependant, à l'heure actuelle,

aucune étude n'a été menée sur des CE exposées avec des PM de latérites riche en Ni prélevées en Nouvelle-Calédonie.

Objectifs :

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude sont :

1. d'évaluer, *in vitro*, dans les HPAEC la toxicité de deux types de PM de latérites en étudiant : (i) la cytotoxicité, (ii) l'internalisation, (iii) le stress oxydant, (iv) la réponse pro-inflammatoire et (v) la signalisation calcique.
2. de comparer les potentiels effets toxiques des PM latéritiques aux effets des NPs de NiO afin d'évaluer si le risque de développer des pathologies cardiovasculaires est plutôt dû à l'inhalation de nanoparticules émises de manière anthropique par les activités minières qui émettent des NPs de NiO par les usines et les procédés hydro métallurgiques utilisés, ou bien par l'inhalation de PM naturelles riches en nickel remises en suspension par l'érosion naturelle des sols et les activités humaines.

Impacts of New Caledonian nickel-rich laterite particles on human pulmonary artery endothelial cells: oxidative stress, inflammation and calcium signaling disruption

Ophélie Germande^{abc}, Manon Barbault^{ab}, Marie-Lou Sandri^{ab}, Clément Vecco-Garda^d, Peggy Gunkel-Grillon^e, Stéphane Mornet^d, Emilie Poupin^{af}, Sabrina Lacomme^{ag}, Etienne Gontier^{ag}, Magalie Baudrimont^{ac*} and Isabelle Baudrimont^{ab**}

^a Univ. Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

^b Inserm U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, avenue du Haut Lévêque, Pessac F-33604, France

^c UMR EPOC 5805, Université de Bordeaux-, Place du Dr Peyneau, F-33120, Arcachon, France

^d CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ICMCB, UMR 5026, F-33076 Bordeaux, France

^e Institut des Sciences Exactes et Appliquées, ISEA, Université de la Nouvelle-Calédonie BPR4, 98851 Cedex Noumea, New Caledonia

^f LTPIB Collège Santé, UFR Sciences Pharmaceutiques, Campus Carreire, Bordeaux, FRANCE 33076, FR

^g Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center, BIC, UAR CNRS 3420, US 004, F-33000, Bordeaux, France

First author: ophelie.germande@u-bordeaux.fr

*Co-last authors: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr [and](mailto:isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr) isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr

°Corresponding author: isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr

Abstract

Anthropic activities such as open pit mining, amplify the natural erosion of soils in New Caledonia leading to atmospheric emission of nickel – rich laterite fine particles. After inhalation, endothelial cells in the pulmonary circulation are one of the primary target of particles. The objective of this *in vitro* study was to assess the cytotoxic effects of two types of laterite fine particles, K4 and RT1, on human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). A special attention was paid to cell viability, oxidative stress, inflammation and calcium signaling, critical events involved in the physiopathology of vascular diseases. HPAEC were exposed to K4 or RT1 (0.5-150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) during 4 or 24 h. The following different endpoints were studied: (i) viability cells by spectrophotometry, (ii) ROS production by spectrofluorimetry and confocal microscopy; (iii) inflammation by IL-6 secretion (ELISA) and (iv) calcium signaling by confocal microscopy. K4 and RT1 particles induced oxidative stress evidenced by an increase in ROS production and a pro-inflammatory response with IL-6 secretion. In addition, laterite particles exposure altered calcium homeostasis, with an increase in cytosolic calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). In order, the effects of NiONPs, already characterized on HPAEC, will be compared with the results obtained in this study.

Keywords: nickel – rich laterite particles, pulmonary endothelial cells, cytotoxicity, reactive oxygen species, inflammation, calcium signaling

1. Introduction

The air quality that we breathe directly depends on the air pollutants in the atmosphere. In 2017, an estimate of 7 million premature deaths worldwide were caused by air pollution (Miller et al., 2018) and, in 2022, according to the WHO (World Health Organization), 90 % of the world's population breathes polluted air. The main causes of mortality are cardiovascular and respiratory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cancers and pulmonary hypertension (PH) (Pope et al., 2015, Pope et al., 2004, Beelen et al., 2014, Brown et al., 2002, Chalupa et al., 2004). One can assume that people inhaling air pollutant such as airborne particulate matter (PM) suffering from these preexisting pathologies are at risk of exacerbating vascular diseases. PM are classified according to their sizes with the coarse particles, PM₁₀ with a mean aerodynamic diameter < 10 µm; fine particles PM_{2.5} with a mean aerodynamic diameter < 2.5 µm and ultrafine particles PM_{0.1} with a mean aerodynamic diameter < 0.1 µm. The PM toxicity then depends on their physico-chemical composition and sources. Indeed, PM may have several origins, such as the direct release into the atmosphere from industry, traffic, domestic activities, the chemical transformation of gases and the resuspension of particles from soils by the wind and anthropic activities. This last source is particularly important on fragility and instability soils that are highly erodible, such as nickel - rich laterite soils in New Caledonia, one of the largest nickel producers in the world (Ambatsian et al., 1997). These resources are concentrated in ultramafic formations, that cover nearly 30 % of the New Caledonian subsoils (Isnard et al., 2016). Ultramafic soils are characterized by high concentration of metal trace elements including nickel (Ni), chromium (Cr), cobalt (Co), manganese (Mn) and iron (Fe) (Losfeld et al., 2015). Soils erosion leads to atmospheric emission of PM particles such as nickel – rich laterites. This atmospheric PM emission is amplified by an increased erosion of ultramafic soils due to anthropic activities, such as mining (He et al., 2005, Pasquet et al., 2016b) thus increasing the release of metal – rich PM₁₀, PM_{2.5} and PM_{0.1}. Among the human activities responsible of pollution, mining activities represent the second source of heavy metal soils contamination in the world (Younger, 2001). Furthermore, the natural erosion of those laterite soils is enhanced in New Caledonia due to the tropical climate conditions characterized by heavy rains, strong winds and cyclones. Therefore, it leads to mobilization of metal – rich PM from soils to atmosphere.

However, the strong global Ni use in the world may contribute to increase anthropic and natural emission of PM and hence the risk of PM inhalation by mines workers and surrounding populations. This can lead to public health problems. Recent studies actually revealed a significant contamination of local populations in New Caledonia linked to the enrichment of soils by metals (St-Jean et al., 2018). Moreover, it has been shown that some workers in nickel refineries exhibit an elevated nickel level in lung tissues and develop more cardiovascular diseases

(Norseth, 1994, Andersen and Svenes, 1989, Sunderman et al., 1989). Thus, owing to the nickel significant increase exploitation and to the increase of PM anthropic emission, it is crucial to focus on the toxic effect of nickel – rich laterite PM for risk assessment of workers and surrounding population in New Caledonia.

After inhalation, PM penetrate into the respiratory tract and are delivered more or less deeply into the lungs (Saieg et al., 2011, Horemans et al., 2012). PM₁₀ accumulate in the pharynx and the larynx where they can be expectorated. PM_{2.5} and PM_{0.1} can be deposited all along the tracheobronchial tract, and, finally, the finest ones and some of their soluble constituents such as metals can be transported to the pulmonary alveoli, cross the pulmonary epithelial barrier to reach the pulmonary circulation (Miller et al., 2017, Oberdorster et al., 1994). They can there be directly in contact with endothelial cells (ECs) lining the inner surface of arteries, in addition, soluble compounds, including metals, adsorbed on the surface of PM can also cross the alveolar barrier and come into direct contact with EC (Nemmar et al., 2002, Nemmar et al., 2001). The ECs play a key role in pulmonary vascular physiology by controlling vascular tone, blood flow, coagulation and calcium homeostasis (Sandow et al., 2012). So, any alterations of ECs can lead to vascular dysregulation, and thus to the development or exacerbation of cardiovascular pathologies.

Furthermore, some *in vivo* studies have shown that exposure to Ni - rich PM induces pulmonary toxicity characterized, on the one hand, by pulmonary inflammation with a significant increase in neutrophils, eosinophils, macrophages, pulmonary lymphocytes and alveolar proteinosis and, in the other hand, by pulmonary fibrosis (Senoh et al., 2017, Chang et al., 2017b, Mo et al., 2019). Both events are known to play an important role in cardiovascular diseases (Rafikova et al., 2019). Among the pro-inflammatory cytokines secreted, the interleukine-6 (IL-6) is particularly produced by EC after PM exposure, a cytokine involved in cardiovascular disease such as pulmonary hypertension (PH), the main disease of the pulmonary arterial circulation (Bengalli et al., 2017, Brown et al., 2000, Chaouat et al., 2009).

In vitro studies have also demonstrated that PMs induce oxidative stress and calcium signaling alterations, which both are critical events involved in the physiopathology of PH (Guibert et al., 2007, Lai et al., 2015, Deweirdt et al., 2017). Regarding calcium signaling alterations, previous studies have shown that exposure of intrapulmonary arteries to PM_{0.1} disrupts vascular reactivity (Courtois et al., 2010, Ying et al., 2013) with an increase of cytoplasmic calcium concentration (Deweirdt et al., 2020).

However, although endothelial dysfunction plays a major role in the pathogenesis of vascular disease, the toxicity of nickel – rich laterite PM from New Caledonia in human pulmonary endothelial cells have not yet been reported. In this context, the objectives of this *in vitro* study were to assess the toxicity of two types of nickel –

rich laterite PM, K4 and RT1, in human pulmonary artery endothelial cells arteries (HPAEC) by investigating: (i) nickel – rich laterite PM characterization and internalization, (ii) cytotoxicity, (iii) oxidative stress, (iv) pro-inflammatory response and (v) calcium signaling. Another aim of this study is also to compare the effects of these nickel – rich laterite PM, with those of NiONPs on the same cell type, HPAEC, already study in a previous research (Germande et al., 2022). The objective is to identify the most toxic particles on HPAECs, whether it is atmospheric PM or NiONPs which come from factories and mining activities, and thus, to determine where the major risk for the population and workers in New Caledonia comes from.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) cells were cultured in the Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) from PromoCell®. The standard physiological salt solution (PSS) was composed of: 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg²⁺ and 2 mM Ca²⁺; adjusted at pH = 7.4. The Krebs-HEPES Buffer (KHB) was composed of 118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 4 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 6 mM D-Glucose. Fluo-4-AM green dye (1 µM) and Hoechst 33342 blue dye (2 µM) were obtained from ThermoFischer Scientific, Invitrogen™ (France).

2.2. Human pulmonary arterial endothelial cells culture

Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) isolated from pulmonary artery main branch of a 37-years-old female Caucasian donor (N°451Z031.14) were purchased from PromoCell® (Germany). HPAEC were cultured in ECGM supplemented with Supplement Mix, according to the manufacturer's guidelines (PromoCell®). All experiments were done on HPAEC form passage 2 to 8 and cells were cultured at 37 °C and 5 % CO₂.

2.3. Nickel – rich laterite PM

2.3.1. Nickel – riche laterite PM characterization

Two types of nickel – riche laterite PM were collected in two differents sites in New Caledonia in 2013 : RT1, sample collected in the Taléa-coco river watershed, downstream of a mining site at Mount Koniambo in the north of the island; and K4, sample collected in the mining site of Mount Koniambo. Samples were analyzed by the ISEA lab in the University of Noumea for metals composition. The nickel – riche laterite PM were ground *in situ* to obtain particles of the order of 10µm (PM₁₀), then, a second grinding stage was carried out at the University of Bordeaux. This last grinding stage, which made it possible to obtain particles of the size of PM_{2.5}, was carried out at the LTIPIB (Laboratoire de Technologie Pharmaceutique Industrielle de Bordeaux) using a roller mill (Fritsch

pulverisette 7®) with 5 cycles of 60 seconds at 8 rpm. Then, RT1 and K4 were suspended in ECGM at a final stock solution concentration of 2 mg/mL and stored at 4°C until use. Prior use, stock suspensions were vortexed, sonicated for 3 x 30 s (Vibracell 75186, 130 W, 56 - 60 Hz) and diluted extemporaneously in ECGM at appropriate concentrations (0.5 - 150 µg/cm²).

2.3.2. Hydrodynamic size distributions

The hydrodynamic size distribution of RT1 and K4 dispersed in ECGM was determined at a concentration of 9.5 µg/ml (5 µg/cm²) by Dynamic Light Scattering (DLS) using a VASCO particle size analyzer from Cordouan Technologies®, as previously described (Deweirdt et al., 2020, Germande et al., 2022). The size distribution data were analyzed using a probabilistic self-learning algorithm, so-called Sparse Bayesian Learning (SBL) adapted for very poly-dispersed particle suspensions to improve the resolution of multimodal size distributions.

2.4. Nickel – rich laterite PM internalization

Transmission Electron Microscope (TEM) was used to study K4 and RT1 internalizations. Cells were seeded at 20 000 cells/cm² in Lab-Teck chambers (Dutsher, France), and cultured in supplemented ECGM, for 24 h at 37°C and 5 % CO₂. Cells were then exposed or not to K4 or RT1 at 5 µg/cm². After a 4 h-exposure to laterites, cells were fixed with 1.6 % paraformaldehyde and 2 % glutaraldehyde in 0.08 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 h at room temperature (RT). After washing in 0.1 M cacodylate buffer, cells were post-fixed in a mix of 1 % osmium tetroxide (v/v)/ 1 % potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆ (p/v) in 0.1 M cacodylate buffer, for 2 h, on ice in the dark. Then, samples were washed in water and stained in 0.5 % aqueous uranyl acetate solution for 30 min at RT and in the dark. Subsequently, cells were washed, dehydrated through a series of graded ethanol, and finally embedded, first in a mixture of pure ethanol and epoxy resin 50/50 (v/v) (Epon 812; Delta Microscopie, Toulouse, France) for 2 h and then in 100 % resin overnight at RT. The resin polymerization was achieved after 48 h at 60°C. Samples were then cut using a diamond knife (Diatome, BielBienne, Switzerland) using an ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were laid on copper grids and then stained with Uranylless (Delta Microscopies, Toulouse, France) and lead citrate. Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

2.5. Cytotoxic assay

Cell viability was assessed using the WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) cell proliferation reagent (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations. This assay assumes that the relative number of viable cells is proportional with the mitochondrial enzymatic activity. Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h. After a 24 h-exposition with K4 or RT1 (1 - 150 µg/cm²), cells were rinsed with ECGM and

incubated for 3 h with WST-1 reagent. The absorbance was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany). The working concentrations for all further experiments were determined by this test (mortality rate less than 30 %).

2.6. Oxidative stress

2.6.1. Global ROS production

Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 12-well, 24-well or 96-well plates and cultured for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were then exposed to NiONPs at different concentrations (0.5 - 5 µg/cm²) for 4-h. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was assessed using the CM-H₂DCFDA probe (Fisher Scientific®), according to the manufacturer's recommendations. Cells were rinsed with ECGM without serum and were pre-incubated for 20 min with CM-H₂DCFDA probe (final concentration 20 µM) before the PM exposition for 4-h. Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at 485/520 nm (excitation/emission) by using FLUOstar Omega 2.10 plate reader, and the analyses were performed with MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®).

2.6.2. Mitochondrial O₂⁻ production

Production of mitochondrial superoxide anion was assessed by confocal microscopy (TE 2000, Nikon) using MitoSOX™ red dye (ThermoFischer®), according to the manufacturer's recommendations. After a 4 h-exposure to PM, cells were incubated for 30 min (37°C, in the dark), with a MitoSOX™ probe in physiological salt solution (PSS). The MitoSOX™ probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensity was measured for MitoSOX™ at 543/605 nm and Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). For all the confocal microscopy experiments, the plates were observed with an X 200 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope. MitoSOX™ fluorescence intensity is proportional to the rate of probe oxidation. Analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.6.3. Superoxide dismutase enzymatic activity

The superoxide dismutase (SOD) enzymatic activity was measured with a commercially available kit (19160 SOD determination kit, Sigma-AldrichVR, USA). This kit also uses WST-1, which produces a water soluble formazan dye upon reduction with the O₂⁻. The rate of the reduction with O₂⁻ is linearly related to the xanthine oxidase activity and is inhibited by SOD. The IC₅₀ (50% inhibition of SOD activity) was determined by a colorimetric method. Inhibition of SOD activity can be quantified by measuring the decrease in color development at 440 nm. After a 24 h-exposure to PM, supernatants were used for analysis according to the manufacturer's

recommendations to determine SOD activity. The absorbance of supernatants was measured at 440 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG LabtechVR, Germany).

2.7. Pro-inflammation effect: cytokines IL-6 secretion

The IL-6 protein production into the supernatants was detected by ELISA assay (Human IL-6 DuoSet® ELISA R&D Systems, USA). Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in 12-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were rinsed with medium culture and exposed to PM (0.5 - 5 µg/cm²) for 24 h. The supernatant was removed, centrifuged and analyzed according to the manufacturer's guidelines. The absorbance was measured at 450 nm, corrected at 570 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano 2.10, BMG Labtech®, Germany).

2.8. Cytoplasmic calcium measurement

Intracellular calcium [Ca²⁺]_i was detected using the Fluo-4-AM green dye according to the manufacturer's guidelines. Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. After a 4 h-exposition with PM (0.5 - 5 µg/cm²), cells were incubated for 30 min (37°C, in the dark), with different fluorescents probes in PSS. Fluo-4-AM probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensity was measured for Fluo-4-AM at 488/515 nm and for Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). For each experiment 20 at 30 cells were analyzed per well. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.9. Statistical analysis

Each experimental condition was independently repeated several times (n indicates the number of experiments) and for each independent experiment, 3 to 8 wells per condition were performed. Data are expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM) for n independent experiments. Statistical analyses were assessed using analysis of variance: one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons (n > 30), and by Kruskal Wallis test followed by Dunn's post- test (n < 30). (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 and **** P < 0.0001) with GraphPad statistics software. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of nickel – rich laterite PM

The nickel – rich laterite PM composition was assessed and results showed that the K4 and the RT1 are composed of respectively 7 % and 4.83 %, of Ni. Ni is the most concentrated metal after Fe with 91.61 % and 94.61 % respectively for K4 and RT1 (table 1).

Dynamic light scattering measurement (DLS) was implemented to assess the colloidal stability state of RT1 and K4 in the culture medium. The results for K4 at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ showed three peaks detected at 54.34 nm; 552.95 nm and 3242.22 nm with a mean at 1882.18 nm. For RT1, at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, three peaks were observed too, at 113.72 nm; 862.47 nm and 2497.99 nm with a mean at 1236.69 nm (fig. 1). These results confirmed that the size of the studied particles corresponds to that of PM_{2.5}.

Table 1 : Composition of K4 and RT1 laterites in g/kg and in percentage (%).

	K4		RT1	
	g/kg	%	g/kg	%
Ni	22,3	7,00	19,52	4,83
Co	0,66	0,21	0,4	0,10
Mn	3,78	1,19	1,87	0,46
Fe	292	91,61	382,86	94,61

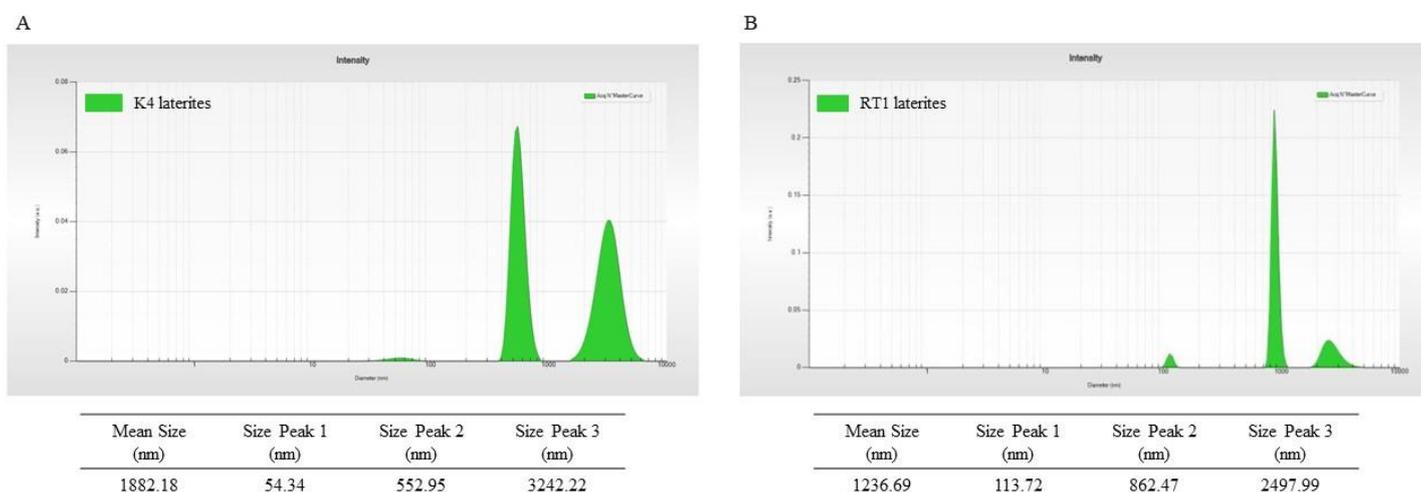


Figure 1 : Size distribution of K4 and RT1 laterites in ECGM at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ measured by DLS. (A) K4 laterites DLS. (B) RT1 laterites DLS.

3.2. Nickel – rich laterite PM internalization

TEM was performed to observe nickel – rich laterite PM uptake and localization in HPAEC after a 4 h-exposure (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Control cells are shown in fig. 2A. After a rapid internalization, nickel – rich laterite PM were mainly

clustered in vesicles in the cytoplasm for the two nickel – rich laterite PM, K4 (fig. 2B) and RT1 (fig. 2C). Internalized nickel – rich laterite PM were mostly organized in aggregates of various sizes. Nickel – rich laterite PM were also localized near the nucleus or near mitochondria.

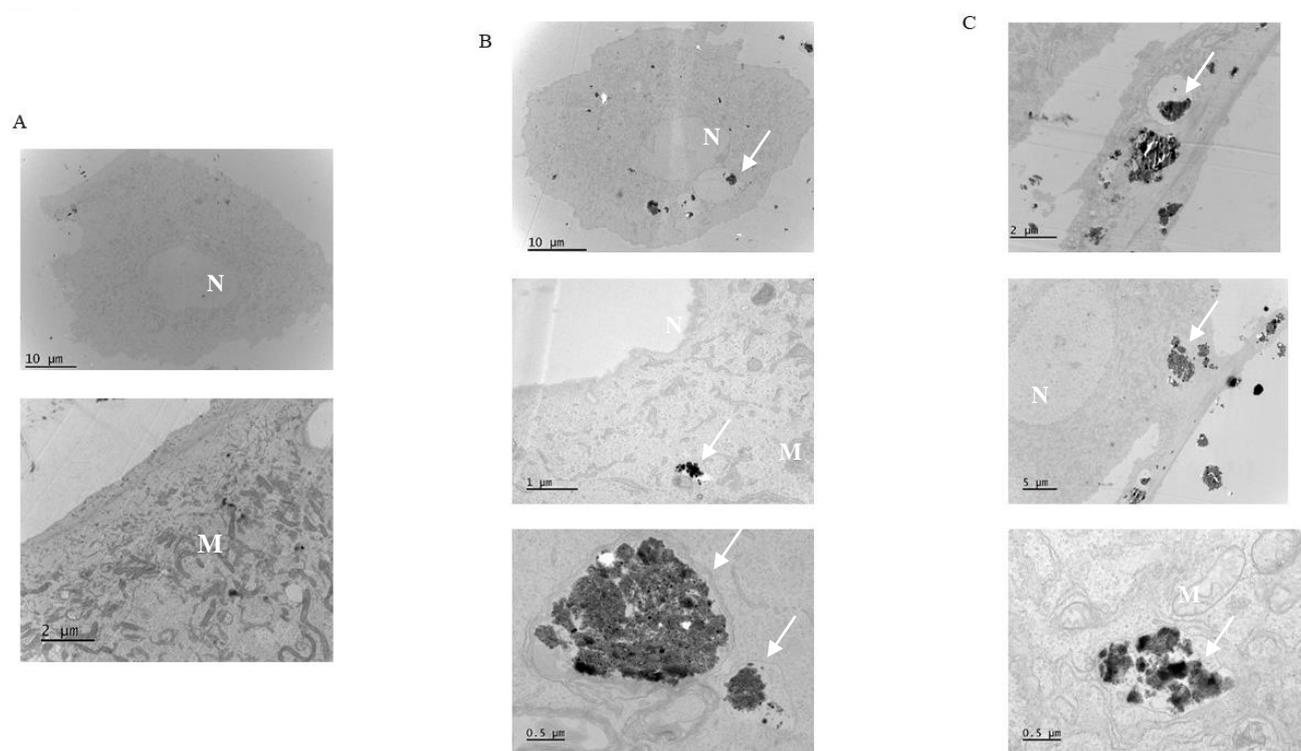


Figure 2 : internalization and intracellular localization of k4 and rt1 laterites in hpaec. White arrows show intracellular laterite aggregates, 'n' corresponds to the nucleus; 'm' corresponds to the mitochondria. (a) controls cells, (b) k4 internalization, (c) rt1 internalization.

3.3. Nickel – rich laterite PM decrease viability cell

To understand the mechanism of nickel – rich laterite PM- induced effect in HPAEC, the non-toxic range of K4 and RT1 concentrations (mortality rate < 30 %) was first investigated by the WST-1 test. Cytotoxic effect was performed on HPAEC after a 24-h treatment with PM. The results show a significant and concentration-dependent decrease of cell viability from 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for both PM (54.95 % for K4 and 52.2 % of viability for RT1, *** $P < 0.001$) as compared to untreated cells (fig. 3). These results also show that the mitochondrial activity of HPAEC decreased in a concentration-dependent manner upon nickel – rich laterite PM exposure.

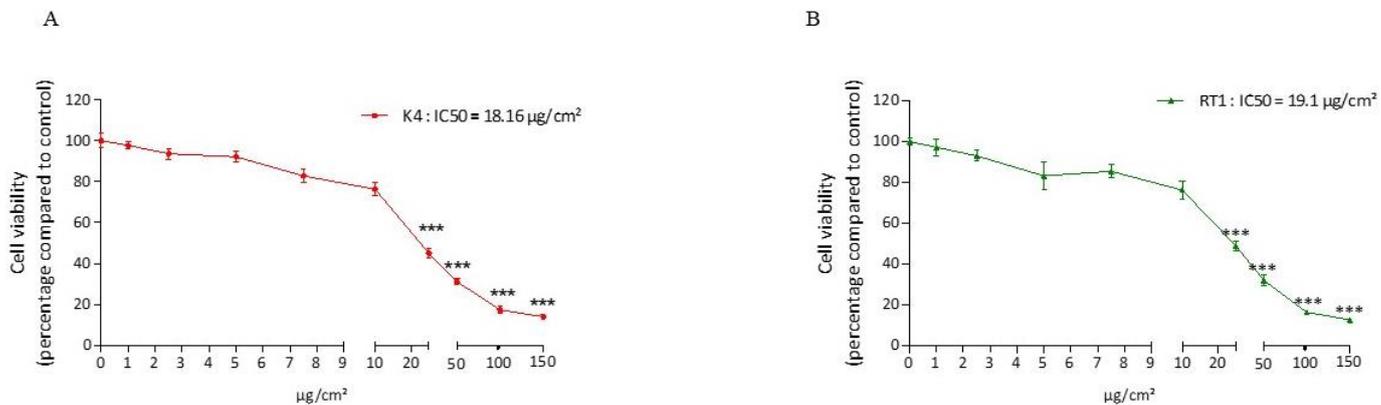


Figure 3 : Viability cells on HPAEC after K4 and RT1 laterites exposure. Cell viability was measured after a 24 h-exposure with K4 or RT1 (1–150 µg/cm²) by the colorimetric WST-1 assay. Results are expressed as the percentage of cell viability in treated cells, as compared to control cells (100%). Data were mean ± SEM of four independents experiments, n = 4 (eight wells/ concentration). (A) Cell viability after K4 exposure. (B) Cell viability after RT1 exposure. Statistically significant at p < 0.001(***) as compared to untreated control cells.

3.4. Nickel - rich laterite PM induce oxidative stress

3.4.1. Global ROS production

After a 4 h-exposure of HPAEC to K4 and RT1 (0.5 - 5 µg/cm²), a significant and concentration-dependent increase of intracellular global ROS production is observed at 5 µg/cm² for K4 (82.69 %) and from 2.5 µg/cm² for RT1 (18.88 % and 34.04 % respectively for 2.5 and 5 µg/cm²) as compared to untreated cells (fig. 4).

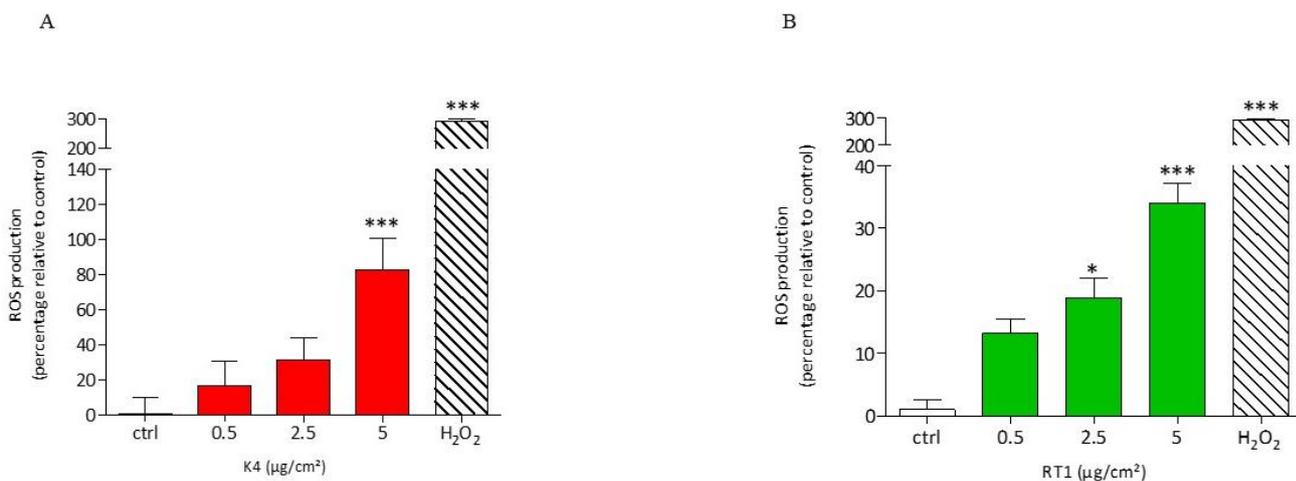


Figure 4 : Global intracellular ROS production after K4 and RT1 laterites exposure. Cells were exposed 4 h with K4 or RT1 (0.5 – 5 µg/cm²) and ROS production was measured by spectrofluorimetry via CM-H₂DCF-DA probe assay. The values were normalized to untreated cells, and results are expressed as the percentage of CM-H₂DCF-DA probe fluorescence intensity increase relative to control cells. H₂O₂ was used as positive control (final concentration 1mm). Data are mean ± SEM of five independents experiments, n = 5 (three wells/ concentration) (A) ROS production after K4 exposure. (B) ROS production after RT1 exposure. Statistically significant at p < 0.05(*) and p < 0.001(***) as compared to untreated control cells.

3.4.2. Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production

After a 4 h-exposure of HPAEC to K4 and RT1 (0.5 - 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a significant and concentration-dependent increase of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production is observed at 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for K4 (119.32 and 136.7 % respectively) and from the lowest concentration for RT1 (109.4 %; 109.9 % and 126.2 % respectively for 0.5, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (fig. 5).

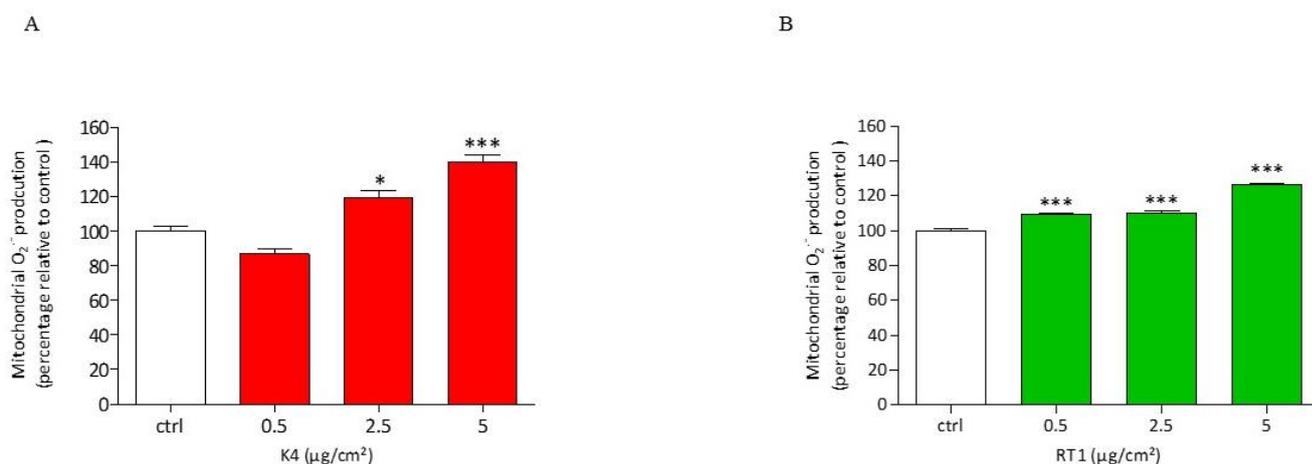


Figure 5 : Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production after K4 and RT1 laterites exposure. Cells were exposed 4 h with K4 or RT1 (0.5 – 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ was measured with MitoSOX probe (final concentration 5 mM) by confocal microscopy. The values were normalized to untreated cells and results are expressed as the percentage of MitoSOX probe fluorescence intensity, relative to control cells. Data are mean \pm SEM of three independent experiments, $n = 3$ (five wells/ concentration). (A) Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production after K4 exposure. (B) Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production after RT1 exposure. Statistically significant at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.001$ (***) as compared to untreated control cells.

3.4.3. SOD activity

After a 24 h-exposure of HPAEC to K4 and RT1 (0.5–5 mg/cm^2), a significant increase in SOD enzymatic activity is observed at the highest concentration for K4 (1046.62 U/mg of proteins) and from 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ for RT1 (0.062 and 0.082 U/mg of proteins respectively for 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to the untreated cells (0.023 and 0.026 U/mg of proteins respectively for K4 and RT1) (fig. 6).

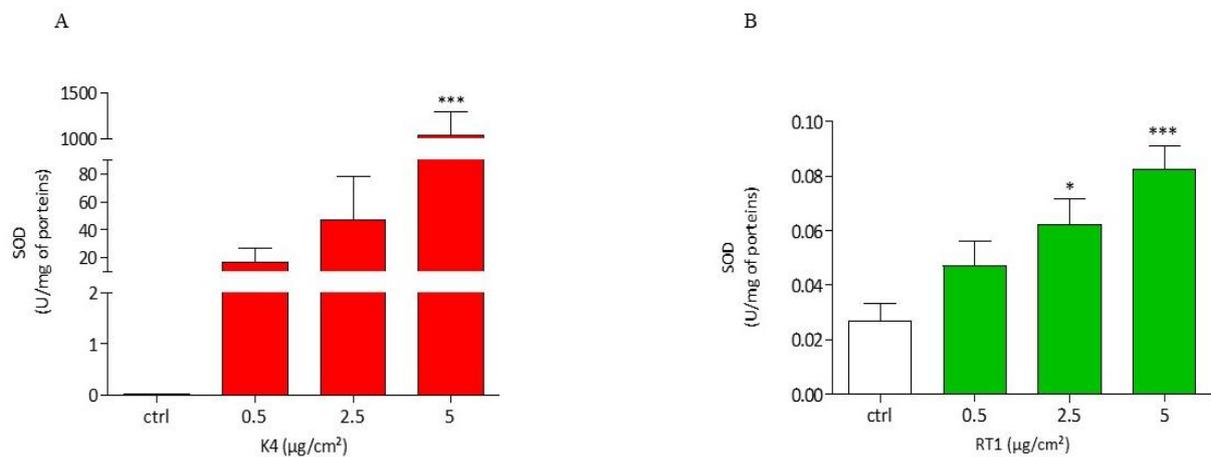


Figure 6 : SOD activity after K4 and RT1 laterites exposure. Cells were exposed 24 h with K4 or RT1 (0.5 – 5 µg/cm²) and SOD activity was measured by a colorimetric test by spectrophotometry. The results were expressed as SOD Units/mg of proteins. Data are mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (three wells/concentration). (A) SOD activity after K4 exposure. (B) SOD activity after RT1 exposure. Statistically significant at p < 0.05(*) and p < 0.001(***) as compared to untreated control cells.

3.5. Nickel - rich laterite PM increase IL-6 secretion

The secretion of IL-6 was measured by ELISA assay in HPAEC. After a 24 h-exposure of cells to K4 or RT1 (0.5 - 5 µg/cm²), the results show for both particles a significant increase of IL-6 secretion at 5 µg/cm² (286.75 and 634.08 pg/mg of proteins, respectively for K4 and RT1) as compared to untreated cells 231.08 and 310.37 pg/mg of proteins respectively for controls of K4 and of RT1 (fig. 7).

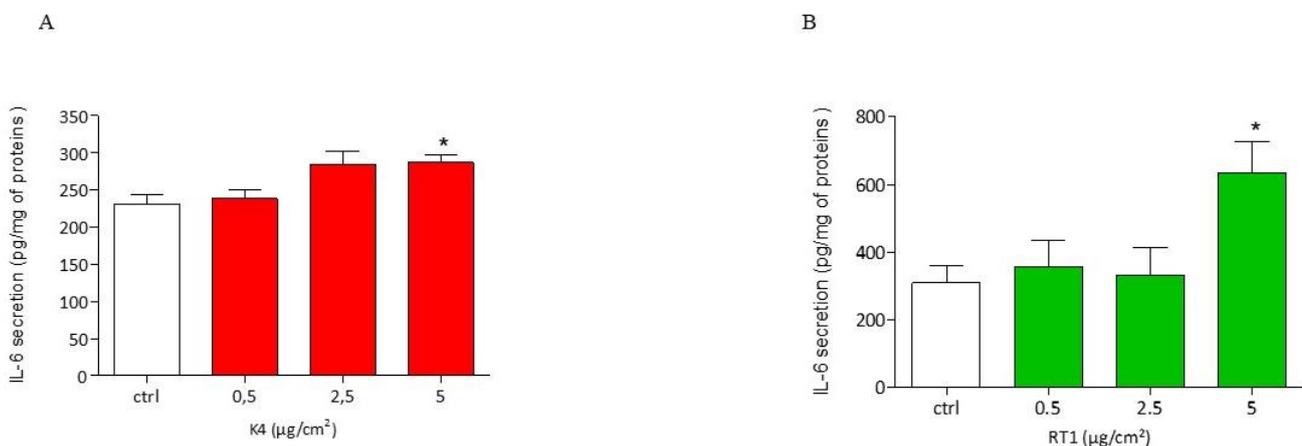


Figure 7 : IL-6 secretion in HPAEC after exposure with K4 and RT1. Cells were exposed 24 h with K4 or RT1 (0.5 – 5 µg/cm²) and IL-6 secretion was measured by ELISA assay. The results were expressed as pg/mg of proteins. Data are mean ± SEM of six independent experiments, n = 6 (three wells/concentration). (A) IL-6 secretion after K4 exposure. (B) IL-6 secretion after RT1 exposure. Statistically significant at p < 0.05(*).

3.6. Nickel - rich laterite PM increase cytosolic calcium level

After a 4 h-exposure with K4 and RT1 (0.5 - 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) the results show a significant increase of the basal cytoplasmic calcium level at the highest concentration for K4 (127.64 %) and from the lowest concentration after RT1-exposure (116.6 %; 118.9 % and 129.2 % respectively for 0.5; 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (fig. 8).

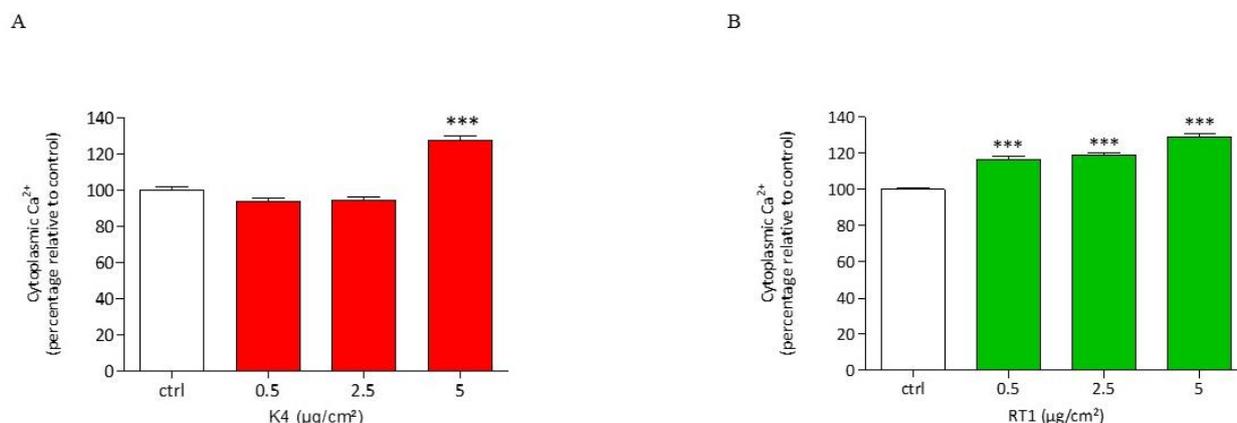


Figure 8 : Calcium level in HPAEC after K4 or RT1 exposure. Cells were exposed 4 h with K4 or RT1 NiONPs (0.5 – 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Cytoplasmic Ca^{2+} levels were measured by confocal microscopy with Fluo-4AM probe (final concentration 1 mM). Fluo-4FF, AM probe (10 mM) and Rhod-2AM probe (1 mM). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the percentage of the probes fluorescence intensity relative to the control cells (100 %). (A) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after K4 exposure. (B) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after RT1 exposure. Statistically significant at $p < 0.001$ (***) as compared to untreated control cells.

4. Discussion

It was first of all interesting to compare the effects of the two types of nickel – rich laterite PM, taken from two different locations, in order to investigate if their different composition and size distribution led to a difference in the toxic effects observed on HPAEC. Our results showed that, overall, the same effects were observed on HPAEC, such as: cytotoxic effects; global ROS and mitochondrial O_2^- productions; SOD activity; IL-6 secretion and Ca^{2+} homeostasis alterations. However, for some experiments, the responses were more or less important. For instance, ROS and mitochondrial O_2^- productions, SOD response and cytoplasmic Ca^{2+} levels were disrupted at lower concentrations of exposure for RT1 compared to K4, leading to a more important inflammation response. This can be explained in large part by the different levels of metals in these nickel – rich laterite PM (7 % of Ni and 91.61 % of Fe in K4 as compared to RT1 composed by 4.83 % of Ni but 94.6 % of Fe), but also by the differences in size distribution with smaller sizes of RT1 compared to K4, especially for the highest particles size (around 2500 nm and 3200 nm respectively). Indeed, it is known that the size and composition of particles affect their toxicity (Sabella et al., 2014). The effect of RT1 from lower concentrations can be explained by the fact that the smallest particles are the most toxic. Nevertheless, the responses were measured for these two types of nickel – rich laterite PM in the same range of concentrations of exposure, so we assume for the rest of the

discussion that we can globalize their responses to compare them to the effects of NiONPs on the same cell type, HPAEC, owing to the fact that the largest part of Ni particles released from mining activities correspond to NiONPs (around 50 nm).

The nickel – rich laterite PM cytotoxic effect on HPAEC has been evaluated, on the one hand, to select the concentrations (mortality rate < 20 %) that were used for all the mechanistic experiments and, on the other hand, to compare the cytotoxicity of these nickel – rich laterite PM with NiONPs toxicity in order to see whether particles size and composition could have an impact on cytotoxicity. Taking into account the respiratory rate for a healthy man (20 L/min., 12-h/day exposure), the alveolar deposits (20–50 %), the alveolar surface (75 m²), and the possible internalization of the finest particles in endothelial cells, the different concentrations used in this study (0.5–5 mg/cm²) are realistic concentrations close to the ones found from PM_{2.5} exposure in New Caledonia near nickel mines [Scal’AIR, 2018] (Akerlund et al. 2019). Firstly, our results showed that nickel – rich laterite PM seemed less cytotoxic than NiONPs on HPAEC. Indeed, the IC₅₀ for nickel – rich laterite PM were 18.16 µg/cm² (for K4) and 19.1 µg/cm² (for RT1), as compared to 12.79 µg/cm² for NiONPs (Germande et al., 2022).

When HPAEC were exposed to nickel – rich laterite PM, these particles were quickly internalized into the cytoplasm, into vesicles, in aggregates of different sizes. Some aggregates were localized very close to nucleus and mitochondria suggesting that they could lead to mitochondrial dysfunction. This cytotoxic effect is otherwise observed with the WST-1 test showing an alteration of mitochondria. Like other metallic particles the nickel – rich laterite PM internalization could be a key factor in their toxicity (Munoz and Costa, 2012). It is well known that the acidic pH of some organelles can facilitate the release of different ions, like Fe³⁺ or Fe²⁺, Mn²⁺, Co⁺ or Ni²⁺ probably responsible for toxicity and oxidative stress generation (Sabella et al., 2014). It has been shown that one of the key mechanisms leading to metal particles and PM_{2.5} cytotoxicity is an overproduction of ROS (Ivask et al., 2015, Abdal Dayem et al., 2017, Deweirdt et al., 2017, Germande et al., 2022). Our results demonstrate that in HPAEC, nickel – rich laterite PM increased global ROS production with a large increase at the highest concentrations. It is interesting to point out that NiONPs generate an overproduction of ROS at very low concentrations (from 0.5 µg/cm²) as compared to nickel – rich laterite PM (from 2.5 µg/cm²) (Germande et al., 2022). However, at 5 µg/cm², the percentage of ROS production is higher after nickel – rich laterite PM expositions (82.69 % and 34.04 % for K4 and RT1 respectively) as compared to NiONPs (15.57 %). Furthermore, transition metals, such as Ni, are known to produce reactive free radicals, like O₂^{•-}, via the Fenton reaction (Abdal Dayem et al., 2017) which needs Fe²⁺. Our results show that nickel – rich laterite PM are also composed of Fe more than 90 %. Those data could explain the high percentage of ROS produced by nickel – rich laterite PM. Our

previous study carried out on HPAEC, has shown a significant increase of $O_2^{\cdot-}$ production in the mitochondria after a 4 h-exposure to NiONPs (Germande et al., 2022). Our present study suggests that HPAEC cells possess the same capacity to induce $O_2^{\cdot-}$ production after exposition with nickel – rich laterite PM as compared to NiONPs and a greater capacity to generate global ROS production. However, the mortality is lower at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ after nickel - rich laterites exposition as compared to NiONPs (7.9 %, 16.8 % and 31.8 % of mortality for K4, RT1 and NiONPs respectively) that can be explained by the presence of Mn that could activate the antioxidant system, particularly the Manganese-SOD (Mates and Sanchez-Jimenez, 2000). NPs such as NiONPs are known to decrease the antioxidant enzyme activity on HPAEC (Germande et al., 2022). Several authors have demonstrated that these antioxidant enzymes undergo functional changes by direct interactions with NPs (Zhang et al., 2019) probably due to their small size and their great surface reactivity. In the present study, on the contrary, we show that nickel – rich laterite PM activate this antioxidant system characterized by an important increase of SOD activity. One can assume that the antioxidant system activity is greater after nickel - rich laterite PM exposition than after NiONPs exposition, leading to a lower cell mortality. These results can therefore be explained, on the one hand, by the size of the particles and, on the other hand, by the chemical composition and particularly the presence of Mn in nickel – rich laterite PM. Indeed, we noticed that the K4 laterites are composed of 1.2 % of Mn and activate the SOD antioxidant enzyme much more than the RT1 laterites which contain only 0.46 % of Mn.

In view of the localization of nickel – rich laterite PM in the cytoplasm (close to mitochondria), the importance of mitochondrial oxidative stress and the disruption of succinate dehydrogenase enzyme activity, nickel - rich laterite PM could alter mitochondrial function. Indeed, $O_2^{\cdot-}$ may induce mitochondrial membrane lipoperoxidation, leading to a mitochondrial membrane potential impairment, as it was already shown after PM and NiONPs exposition (Deweirdt et al., 2020, Germande et al., 2022). The mitochondrial respiratory chain and the β -oxidation could therefore be altered and then activate apoptosis and cell death (Prakash et al., 2017). The present results demonstrate that the mortality observed after nickel – rich laterite PM exposition, could be due to mitochondrial alteration that could contribute to endothelial dysfunction leading to vascular lung diseases (Chambers et al., 2018). Furthermore, some studies report that cardiovascular diseases are also associated with mitochondrial impairment due to oxidative stress (Chistiakov et al., 2018, Freund-Michel et al., 2014).

It is well known that an enhanced ROS production after $\text{PM}_{2.5}$ exposure might activate the pro-inflammatory pathways via the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 (Zhang et al., 2012, Bengalli et al., 2017),

and in particular on HPAEC after PM_{0.1} exposure (Karoly et al., 2007). This study shows that nickel – rich laterite PM induce a pro-inflammatory response characterized by an IL-6 secretion increase as well as NiONPs exposure.

And IL6 secretion is a major biomarker of cardiovascular disease, including pulmonary hypertension (Tamura et al., 2018, Rafikova et al., 2019).

Knowing the key role of calcium homeostasis in endothelial dysfunction, the effect of nickel - rich laterite PM exposure on calcium signaling was also evaluated in HPAEC. The nickel – rich laterite PM increased the basal calcium level. These results are in line with our previous published data after NiONPs exposure on HPAEC. However, this increase is observed from 0.5 µg/cm² after NiONPs exposure and only at the highest concentration (5 µg/cm²) after nickel – rich laterite PM exposure. So, as for the other experiments, this alteration is more important after NiONPs exposure. Previous studies have shown that metallic oxide NPs, like NiO, NiCl₂ or CeONPs, could interact with the membrane calcium channels like stretch activated channels due to the NPs ionization that relays cations like Ni²⁺ or Ce²⁺ (Xiang et al., 2016, Germande et al., 2022, Cortijo et al., 2010). So, any alteration of membrane calcium channels and calcium homeostasis can lead to vascular dysregulation and thus to the development or exacerbation of cardiovascular diseases (Sanchez et al., 2017).

All these results suggest also that the physico-chemical characteristics of particles as the size and the metallic composition are main parameters involved in the toxic effects. However, we have compared, on HPAEC, the results after NiONPs exposure to the results after nickel – rich PM laterite exposure. These particles have not the same size (around 2500 nm and 3200 nm respectively for K4 and RT1 and around 50 nm for NiONPs), so, it could be interesting to compare NiONPs and nickel – rich laterite particles of the same size to see if the differences are mainly due to the size or the physico-chemical composition.

Indeed, we showed that metals and in particular Ni, Fe and Mn contained in particles such as nickel – rich laterite PM were involved in particles-induced vascular deleterious effects, even if the presence of Mn can increase the SOD production. Furthermore, these metals could present additive or synergistic interactions with particle surface area. These nickel-rich laterites induced-intracellular ROS production could then occur as the result of free radicals production at the surface of the particles or by soluble harmful metals that are likely to be involved in vascular diseases. Finally, the small size of nickel-rich laterites particles that can be produced by erosion or mining activities could potentiate the deleterious effects observed because it is known that the surface reactivity of particles is largely enhanced by the decrease of the particles size, especially at the nanometric scale.

Overall results are summarized in figure 9.

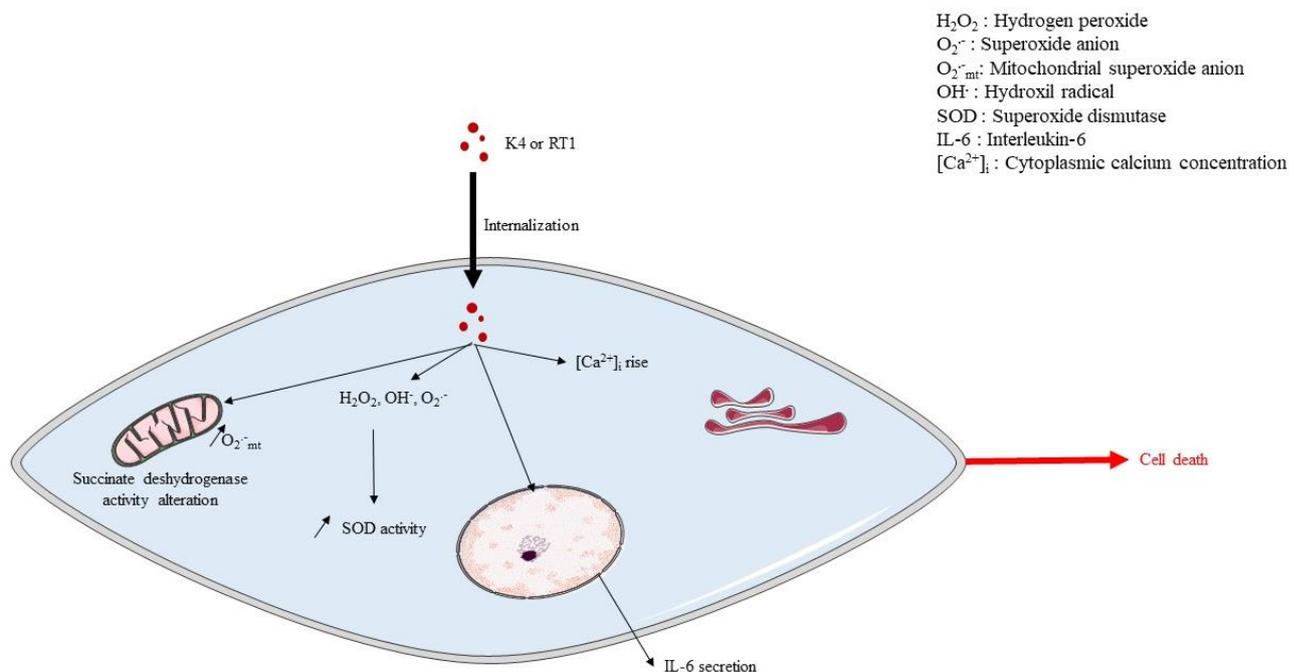


Figure 9 : Summary of main results. Nickel – rich laterite PM caused damages that was dependent on oxidative stress and mitochondrial dysfunction.

Conclusion

The present study shows that nickel - rich laterite PM primarily induce, in HPAEC, an intracellular ROS overproduction with a pro-inflammatory response characterized by an IL-6 secretion and a cytoplasmic $[Ca^{2+}]_i$ rise. In addition, these laterites trigger endothelial toxicity through oxidative stress, including the induction of mitochondrial ROS generation and an activation of the anti-oxidant system. Furthermore, we have demonstrated that nickel - rich laterite PM seemed to be less toxic than NiONPs, but this could be explained by the chemical composition and size of the particles. Finally, this study provides evidence that the nickel - rich laterite PM could lead to endothelial dysfunction which is the main characteristic of hypertensive disease. Thus, exposure to these laterites may be a risk factor for mines workers and surrounding populations in New Caledonia, especially for those that present pre-existent cardio-vascular diseases for the exacerbation of pre-existent cardiovascular diseases.

Funding

We want to thank the CNRT-Nickel and its environment for fundings of QUAVAR project for sampling of nickel – rich PM laterite by Dr Peggy Gunkel-Grillon from the University of Noumea.

This work was supported by a PhD funding from the University of Bordeaux for Ophélie Germande, and all the facilities and financial supports from EPOC and CRCTB.

The authors declare that they have no conflict of interest

References

- ABDAL DAYEM, A., HOSSAIN, M. K., LEE, S. B., KIM, K., SAHA, S. K., YANG, G. M., CHOI, H. Y. & CHO, S. G. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci*, 18.
- AMBATSIAN, P., FERNEX, F., BERNAT, M., PARRON, C. & LECOLLE, J. 1997. High metal inputs to closed seas: The New Caledonian lagoon. *Journal of Geochemical Exploration*, 59, 59-74.
- ANDERSEN, I. & SVENES, K. B. 1989. Determination of nickel in lung specimens of thirty-nine autopsied nickel workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 61, 289-95.
- BEELEN, R., STAFOGGIA, M., RAASCHOU-NIELSEN, O., ANDERSEN, Z. J., XUN, W. W., KATSOUYANNI, K., DIMAKOPOULOU, K., BRUNEKREEF, B., WEINMAYR, G., HOFFMANN, B., WOLF, K., SAMOLI, E., HOUTHUIJS, D., NIEUWENHUIJSEN, M., OUDIN, A., FORSBERG, B., OLSSON, D., SALOMAA, V., LANKI, T., YLI-TUOMI, T., OFTEDAL, B., AAMODT, G., NAFSTAD, P., DE FAIRE, U., PEDERSEN, N. L., OSTENSON, C. G., FRATIGLIONI, L., PENELL, J., KOREK, M., PYKO, A., ERIKSEN, K. T., TJONNELAND, A., BECKER, T., EEFTENS, M., BOTS, M., MELIEFSTE, K., WANG, M., BUENO-DE-MESQUITA, B., SUGIRI, D., KRAMER, U., HEINRICH, J., DE HOOGH, K., KEY, T., PETERS, A., CYRYS, J., CONCIN, H., NAGEL, G., INEICHEN, A., SCHAFFNER, E., PROBST-HENSCH, N., DRATVA, J., DUCRET-STICH, R., VILIER, A., CLAVEL-CHAPELON, F., STEMPELET, M., GRIONI, S., KROGH, V., TSAI, M. Y., MARCON, A., RICCERI, F., SACERDOTE, C., GALASSI, C., MIGLIORE, E., RANZI, A., CESARONI, G., BADALONI, C., FORASTIERE, F., TAMAYO, I., AMIANO, P., DORRONSORO, M., KATSOLIS, M., TRICHOPOULOU, A., VINEIS, P. & HOEK, G. 2014. Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality: an analysis of 22 European cohorts. *Epidemiology*, 25, 368-78.
- BENGALLI, R., LONGHIN, E., MARCHETTI, S., PROVERBIO, M. C., BATTAGLIA, C. & CAMATINI, M. 2017. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environ Pollut*, 231, 1314-1321.
- BROWN, D. M., STONE, V., FINDLAY, P., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2000. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med*, 57, 685-91.
- BROWN, J. S., ZEMAN, K. L. & BENNETT, W. D. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 1240-7.
- CHALUPA, D. C., MORROW, P. E., OBERDORSTER, G., UTELL, M. J. & FRAMPTON, M. W. 2004. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect*, 112, 879-82.
- CHAMBERS, E., ROUNDS, S. & LU, Q. 2018. Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis in Emphysema and Acute Lung Injury. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 228, 63-86.
- CHANG, X. H., ZHU, A., LIU, F. F., ZOU, L. Y., SU, L., LIU, S. K., ZHOU, H. H., SUN, Y. Y., HAN, A. J., SUN, Y. F., LI, S., LI, J. & SUN, Y. B. 2017. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF- beta1 activation in rats. *Hum Exp Toxicol*, 36, 802-812.
- CHAOUAT, A., SAVALE, L., CHOUAID, C., TU, L., SZTRYMF, B., CANUET, M., MAITRE, B., HOUSSET, B., BRANDT, C., LE CORVOISIER, P., WEITZENBLUM, E., EDDAHIBI, S. & ADNOT, S. 2009. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest*, 136, 678-687.
- CHISTIYAKOV, D. A., SHKURAT, T. P., MELNICHENKO, A. A., GRECHKO, A. V. & OREKHOV, A. N. 2018. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med*, 50, 121-127.
- CORTIJO, J., MILARA, J., MATA, M., DONET, E., GAVARA, N., PEEL, S. E., HALL, I. P. & MORCILLO, E. J. 2010. Nickel induces intracellular calcium mobilization and pathophysiological responses in human cultured airway epithelial cells. *Chem Biol Interact*, 183, 25-33.
- COURTOIS, A., ANDUJAR, P., LADEIRO, Y., DUCRET, T., ROGERIEUX, F., LACROIX, G., BAUDRIMONT, I., GUIBERT, C., ROUX, E., CANAL-RAFFIN, M., BROCHARD, P., MARANO, F., MARTHAN, R. & MULLER, B. 2010. Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245, 203-10.

- DEWEIRD, J., QUIGNARD, J. F., CROBEDDU, B., BAEZA-SQUIBAN, A., SCIARE, J., COURTOIS, A., LACOMME, S., GONTIER, E., MULLER, B., SAVINEAU, J. P., MARTHAN, R., GUIBERT, C. & BAUDRIMONT, I. 2017. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol In Vitro*, 45, 340-350.
- DEWEIRD, J., QUIGNARD, J. F., LACOMME, S., GONTIER, E., MORNET, S., SAVINEAU, J. P., MARTHAN, R., GUIBERT, C. & BAUDRIMONT, I. 2020. In vitro study of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: effects on calcium signaling and mitochondrial alterations. *Arch Toxicol*, 94, 2331-2348.
- FREUND-MICHEL, V., KHOYRATTEE, N., SAVINEAU, J. P., MULLER, B. & GUIBERT, C. 2014. Mitochondria: roles in pulmonary hypertension. *Int J Biochem Cell Biol*, 55, 93-7.
- GERMANDE, O., BAUDRIMONT, M., BEAUFILS, F., FREUND-MICHEL, V., DUCRET, T., QUIGNARD, J. F., ERRERA, M. H., LACOMME, S., GONTIER, E., MORNET, S., BEJKO, M., MULLER, B., MARTHAN, R., GUIBERT, C., DEWEIRD, J. & BAUDRIMONT, I. 2022. NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption. *Nanotoxicology*, 1-23.
- GUIBERT, C., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J. P. 2007. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Curr Pharm Des*, 13, 2443-55.
- HE, Z. L., YANG, X. E. & STOFFELLA, P. J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol*, 19, 125-40.
- HOREMANS, B., VAN HOLSBEKE, C., VOS, W., DARCHUK, L., NOVAKOVIC, V., FONTAN, A. C., DE BACKER, J., VAN GRIEKEN, R., DE BACKER, W. & DE WAEL, K. 2012. Particle deposition in airways of chronic respiratory patients exposed to an urban aerosol. *Environ Sci Technol*, 46, 12162-9.
- ISNARD, S., L'HUILLIER, L., RIGAULT, F. & JAFFRÉ, T. 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant and Soil*, 403, 53-76.
- IVASK, A., TITMA, T., VISNAPUU, M., VIJA, H., KAKINEN, A., SIHTMAE, M., POKHREL, S., MADLER, L., HEINLAAN, M., KISAND, V., SHIMMO, R. & KAHRU, A. 2015. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr Top Med Chem*, 15, 1914-29.
- KAROLY, E. D., LI, Z., DAILEY, L. A., HYSENI, X. & HUANG, Y. C. 2007. Up-regulation of tissue factor in human pulmonary artery endothelial cells after ultrafine particle exposure. *Environ Health Perspect*, 115, 535-40.
- LAI, N., LU, W. & WANG, J. 2015. Ca(2+) and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 1081-92.
- LOSFELD, G., L'HUILLIER, L., FOGLIANI, B., JAFFRE, T. & GRISON, C. 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, 5592-607.
- MATES, J. M. & SANCHEZ-JIMENEZ, F. M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 157-70.
- MILLER, K. A., SPALT, E. W., GASSETT, A. J., CURL, C. L., LARSON, T. V., AVOL, E., ALLEN, R. W., VEDAL, S., SZPIRO, A. A. & KAUFMAN, J. D. 2018. Estimating ambient-origin PM2.5 exposure for epidemiology: observations, prediction, and validation using personal sampling in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Expo Sci Environ Epidemiol*.
- MILLER, M. R., RAFTIS, J. B., LANGRISH, J. P., MCLEAN, S. G., SAMUTRTAI, P., CONNELL, S. P., WILSON, S., VESEY, A. T., FOKKENS, P. H. B., BOERE, A. J. F., KRYSZEK, P., CAMPBELL, C. J., HADOKI, P. W. F., DONALDSON, K., CASSEE, F. R., NEWBY, D. E., DUFFIN, R. & MILLS, N. L. 2017. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano*, 11, 4542-4552.
- MO, Y., JIANG, M., ZHANG, Y., WAN, R., LI, J., ZHONG, C. J., LI, H., TANG, S. & ZHANG, Q. 2019. Comparative mouse lung injury by nickel nanoparticles with differential surface modification. *J Nanobiotechnology*, 17, 2.
- MUNOZ, A. & COSTA, M. 2012. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 260, 1-16.
- NEMMAR, A., HOET, P. H., VANQUICKENBORNE, B., DINSDALE, D., THOMEER, M., HOYLAERTS, M. F., VANBILLOEN, H., MORTELMANS, L. & NEMERY, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105, 411-4.
- NEMMAR, A., VANBILLOEN, H., HOYLAERTS, M. F., HOET, P. H., VERBRUGGEN, A. & NEMERY, B. 2001. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1665-8.
- NORSETH, T. 1994. Environmental pollution around nickel smelters in the Kola Peninsula (Russia). *Sci Total Environ*, 148, 103-8.
- OBERDORSTER, G., FERIN, J. & LEHNERT, B. E. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 5, 173-9.
- PASQUET, C., GUNKEL-GRILLON, P., LAPORTE-MAGONI, C., SERRES, A., QUINIQUO, T., ROCCA, F., MONNA, F., LOSNO, R., VAN OORT, F. & CHATEAU, C. 2016. Alternative dry separation of PM10 from soils for

- characterization by kinetic extraction: example of new Caledonian mining soils. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 25105-25113.
- POPE, C. A., 3RD, BURNETT, R. T., THURSTON, G. D., THUN, M. J., CALLE, E. E., KREWSKI, D. & GODLESKI, J. J. 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*, 109, 71-7.
- POPE, C. A., 3RD, TURNER, M. C., BURNETT, R. T., JERRETT, M., GAPSTUR, S. M., DIVER, W. R., KREWSKI, D. & BROOK, R. D. 2015. Relationships between fine particulate air pollution, cardiometabolic disorders, and cardiovascular mortality. *Circ Res*, 116, 108-15.
- PRAKASH, Y. S., PABELICK, C. M. & SIECK, G. C. 2017. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*, 152, 618-626.
- RAFIKOVA, O., AL GHOULEH, I. & RAFIKOV, R. 2019. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development. *Antioxid Redox Signal*, 31, 933-953.
- SABELLA, S., CARNEY, R. P., BRUNETTI, V., MALVINDI, M. A., AL-JUFFALI, N., VECCHIO, G., JANES, S. M., BAKR, O. M., CINGOLANI, R., STELLACCI, F. & POMPA, P. P. 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052-61.
- SAIEG, M. A., CURY, P. M., GODLESKI, J. J., STEARNS, R., DUARTE, L. G., D'AGOSTINO, L., KAHN, H., PINTO, E. M., MAUAD, T., SALDIVA, P. H. & BERNARDI, F. D. 2011. Differential elemental distribution of retained particles along the respiratory tract. *Inhal Toxicol*, 23, 459-67.
- SANCHEZ, A., ALVAREZ, J. L., DEMYDENKO, K., JUNG, C., ALPIZAR, Y. A., ALVAREZ-COLLAZO, J., COKIC, S. M., VALVERDE, M. A., HOET, P. H. & TALAVERA, K. 2017. Silica nanoparticles inhibit the cation channel TRPV4 in airway epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 14, 43.
- SANDOW, S. L., SENADHEERA, S., GRAYSON, T. H., WELSH, D. G. & MURPHY, T. V. 2012. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv Exp Med Biol*, 740, 811-31.
- SENOH, H., KANO, H., SUZUKI, M., OHNISHI, M., KONDO, H., TAKANOBU, K., UMEDA, Y., AISO, S. & FUKUSHIMA, S. 2017. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J Occup Health*, 59, 112-121.
- ST-JEAN, A., BARGUIL, Y., DOMINIQUE, Y., LE BOT, B., AYOTTE, P. & CORDIER, S. 2018. Nickel and associated metals in New Caledonia: Exposure levels and their determinants. *Environ Int*, 118, 106-115.
- SUNDERMAN, F. W., JR., MORGAN, L. G., ANDERSEN, A., ASHLEY, D. & FOROUHAR, F. A. 1989. Histopathology of sinonasal and lung cancers in nickel refinery workers. *Ann Clin Lab Sci*, 19, 44-50.
- TAMURA, Y., PHAN, C., TU, L., LE HIRESS, M., THUILLET, R., JUTANT, E. M., FADEL, E., SAVALE, L., HUERTAS, A., HUMBERT, M. & GUIGNABERT, C. 2018. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 128, 1956-1970.
- XIANG, J., LI, J., HE, J., TANG, X., DOU, C., CAO, Z., YU, B., ZHAO, C., KANG, F., YANG, L., DONG, S. & YANG, X. 2016. Cerium Oxide Nanoparticle Modified Scaffold Interface Enhances Vascularization of Bone Grafts by Activating Calcium Channel of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8, 4489-99.
- YING, Z., XU, X., CHEN, M., LIU, D., ZHONG, M., CHEN, L. C., SUN, Q. & RAJAGOPALAN, S. 2013. A synergistic vascular effect of airborne particulate matter and nickel in a mouse model. *Toxicol Sci*, 135, 72-80.
- YOUNGER, P. L. 2001. Mine water pollution in Scotland: nature, extent and preventative strategies. *Science of the Total Environment*, 265, 309-326.
- ZHANG, H., JI, Z., XIA, T., MENG, H., LOW-KAM, C., LIU, R., POKHREL, S., LIN, S., WANG, X., LIAO, Y. P., WANG, M., LI, L., RALLO, R., DAMOISEAUX, R., TELESCA, D., MADLER, L., COHEN, Y., ZINK, J. I. & NEL, A. E. 2012. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano*, 6, 4349-68.

Résumé et conclusion :

Cette étude s'intéresse aux effets toxiques de PM_{2,5} riches en nickel provenant de Nouvelle-Calédonie représentant la pollution naturellement présente sur l'île via l'érosion des sols. Deux types de latérites ont été récoltées près du Mont Koniambo pour notre étude. Les latérites K4 ont été prélevées dans l'enceinte du site minier KNS au Mont Koniambo, et les latérites RT1 au bord d'une rivière sous influence minière de l'usine KNS.

Dans un premier temps, nous avons montré que, dans les HPAEC, les latérites K4 et RT1 sont internalisées dans des vacuoles cytoplasmiques, sous forme d'agrégats. Ces particules paraissent moins cytotoxiques que les NPs de NiO avec des CI50 respectivement de 18.16 µg/cm² et 19.1 µg/cm² pour les latérites K4 et RT1 contre 12.79 µg/cm² pour les NPs de NiO. En revanche, nous avons montré que les latérites induisent un stress oxydant plus important que les NPs de NiO, mais à de plus fortes concentrations. A 5 µg/cm², les latérites K4 et RT1 entraînent respectivement une augmentation de la production d'ERO de 82.69 % et 34.04 % alors que pour les NPs de NiO cette augmentation n'est que de 15.57 %. De plus, une augmentation importante de la production d'anion superoxyde mitochondriale a été observée ce qui peut s'expliquer par leur composition avec, notamment, plus de 90 % de Fe.

Cependant, la mortalité cellulaire après une exposition avec les latérites est bien moindre qu'après une exposition avec les NPs de NiO. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le système antioxydant est plus performant après une exposition aux latérites au vu de l'activité de la SOD augmentée alors que les NPs de NiO la diminuent. En effet, la SOD mitochondriale utilisant le Mn comme coenzyme pourrait être activée par les latérites qui possèdent du Mn dans leur composition.

Nous avons, par la suite, montré que les latérites déclenchent les voies de l'inflammation mises en évidence par une augmentation de la sécrétion d'IL-6. Cette augmentation est un peu plus importante après une exposition des HPAEC avec les RT1 comparativement aux NPs de NiO.

Dans une dernière étape, nous nous sommes intéressés à l'effet des particules de latérites sur la signalisation calcique. Nos résultats montrent que les latérites entraînent une augmentation plus faible du niveau basal de calcium dans le cytoplasme par rapport aux NPs de NiO.

L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que malgré la toxicité des latérites, le principal risque pour les travailleurs et les populations environnantes viendrait plutôt de l'inhalation des NPs de NiO émises par les activités minières plutôt que de l'inhalation des latérites pour lesquelles

la majorité des effets sont mis en évidence à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ alors que les NPs de NiO sont toxiques dès $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, soit une concentration dix fois plus faible. Notons que les concentrations en Ni dans les PM_{10} se rapprochent plutôt *in vitro* de concentrations de l'ordre de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Objectif 2 : Quels sont les impacts au niveau fonctionnel d'une exposition aux métaux, dont les oxydes de nickel ?

1. Modèle pathologique *in vitro* mimant une dysfonction endothéliale : Les effets nocifs des NPs de NiO sont-ils amplifiés sur des cellules vasculaires humaines cultivées en conditions pathologiques ?

Contexte :

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une exposition aux polluants particulaires et aux NPs pouvait déclencher et/ou exacerber des pathologies cardiovasculaires et pulmonaires. La majorité des études mécanistiques visant à élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des polluants particulaires est réalisée *in vitro*, sur des cellules saines ou *in vivo* sur des rongeurs sains. Très peu d'études, épidémiologique ou mécanistiques, portent sur les effets toxiques de particules inhalées (PM_{2.5} et NPs) sur des populations souffrant déjà d'une maladie cardiovasculaire ou pulmonaire préexistante (McCormack and Mathai, 2019, Deweirdt et al., 2021).

De plus, nous avons précédemment démontré qu'une exposition des cellules HPAEC aux NPs de NiO génère un stress oxydant important associé à une réponse pro-inflammatoire, un dysfonctionnement mitochondrial, des altérations de la signalisation calcique via une altération des canaux TRPV4 et une augmentation de la production du médiateur vasoconstricteur ET-1. Ces événements critiques sont retrouvés dans les maladies cardiovasculaires telle que l'HTP (Germande et al., 2022, Guibert et al., 2007, Lai et al., 2015, Parpaite et al., 2016, Cussac et al., 2020).

Les CE constituant donc une cible privilégiée des particules inhalées, les personnes souffrant de pathologies cardiovasculaires telle que l'HTP pourraient constituer une population à risque. Cependant, les mécanismes par lesquels les NPs de NiO pourraient altérer la signalisation calcique et la fonction mitochondriale dans les HPAEC en conditions pathologiques n'ont pas encore été rapportés.

Objectifs :

L'objectif de cette étude est donc de comparer les mécanismes d'action toxique des NPs de NiO dans des cellules endothéliales cultivées, d'une part, en conditions physiologiques, et d'autre part, en conditions pathologiques mimant la dynamique et l'environnement vasculaires observés dans l'HTP.

Différents paramètres sont étudiés dans les deux conditions expérimentales : (i) la production d'ERO, (ii) la production de nitrites, (iii) la sécrétion d'IL-6, (iv) la signalisation calcique, et (v) le dysfonctionnement mitochondrial, paramètres également altérés dans l'HTP.

Article

NiONP-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment in an In Vitro Pulmonary Vascular Cell Model Mimicking Endothelial Dysfunction

Ophélie Germande ^{1,2,3}, Thomas Ducret ^{1,2}, Jean-Francois Quignard ^{1,2}, Juliette Deweirdt ⁴ ,
Véronique Freund-Michel ^{1,2}, Marie-Hélène Errera ⁵, Guillaume Cardouat ^{1,2} , Pierre Vacher ² ,
Bernard Muller ^{1,2}, Patrick Berger ^{1,2,6}, Christelle Guibert ² , Magalie Baudrimont ^{1,3,*}
and Isabelle Baudrimont ^{1,2,*} 

- ¹ Université de Bordeaux, 146, Rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France; ophelie.germande@u-bordeaux.fr (O.G.); thomas.ducret@u-bordeaux.fr (T.D.); jean-francois.quignard@u-bordeaux.fr (J.-F.Q.); veronique.michel@u-bordeaux.fr (V.F.-M.); guillaume.cardouat@u-bordeaux.fr (G.C.); bernard.muller@u-bordeaux.fr (B.M.); patrick.berger@u-bordeaux.fr (P.B.)
 - ² Inserm U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, Avenue du Haut Lèveque, F-33604 Pessac, France; pierre.vacher@inserm.fr (P.V.); christelle.guibert@u-bordeaux.fr (C.G.)
 - ³ Université de Bordeaux, CNRS, EPHE, UMR EPOC 5805, Place du Dr Peyneau, F-33120 Arcachon, France
 - ⁴ ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation de L'environnement et du Travail, Direction de L'Évaluation des Risques, Unité Évaluation des Substances Chimiques, F-94701 Maisons-Alfort, France; juliette.deweirdt@anses.fr
 - ⁵ Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15260, USA; errera.mhelene@gmail.com
 - ⁶ CHU de Bordeaux, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Service de Pédiatrie Médicale, F-33076 Bordeaux, France
- * Correspondence: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr (M.B.); isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I.B.)



Citation: Germande, O.; Ducret, T.; Quignard, J.-F.; Deweirdt, J.; Freund-Michel, V.; Errera, M.-H.; Cardouat, G.; Vacher, P.; Muller, B.; Berger, P.; et al. NiONP-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment in an In Vitro Pulmonary Vascular Cell Model Mimicking Endothelial Dysfunction. *Antioxidants* **2022**, *11*, 847. <https://doi.org/10.3390/antiox11050847>

Academic Editor: Agnes W. Boots

Received: 6 April 2022

Accepted: 24 April 2022

Published: 26 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The development and use of nanomaterials, especially of nickel oxide nanoparticles (NiONPs), is expected to provide many benefits but also has raised concerns about the potential human health risks. Inhaled NPs are known to exert deleterious cardiovascular side effects, including pulmonary hypertension. Consequently, patients with pulmonary hypertension (PH) could be at increased risk for morbidity. The objective of this study was to compare the toxic effects of NiONPs on human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) under physiological and pathological conditions. The study was conducted with an in vitro model mimicking the endothelial dysfunction observed in PH. HPAEC were cultured under physiological (static and normoxic) or pathological (20% cycle stretch and hypoxia) conditions and exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 4 or 24 h. The following endpoints were studied: (i) ROS production using CM-H₂DCF-DA and MitoSOX probes, (ii) nitrite production by the Griess reaction, (iii) IL-6 secretion by ELISA, (iv) calcium signaling with a Fluo-4 AM probe, and (v) mitochondrial dysfunction with TMRM and MitoTracker probes. Our results evidenced that under pathological conditions, ROS and nitrite production, IL-6 secretions, calcium signaling, and mitochondria alterations increased compared to physiological conditions. Human exposure to NiONPs may be associated with adverse effects in vulnerable populations with cardiovascular risks.

Keywords: endothelial dysfunction; calcium; cyclic stretch; human pulmonary artery endothelial cells; nickel oxide nanoparticles; mitochondria alteration; reactive oxygen species

1. Introduction

Air quality is determined by the pollutants present in the atmosphere and in the air we breathe. In 2017, air pollution was implicated in up to 7 million premature deaths

worldwide [1]. Additionally, human exposure to pollutants has risen as a result of an exponential increase in the use of nanoparticles (NPs) in industry, leading to a public health concern.

Many epidemiological studies have established correlations between the inhalation of ultrafine particle and higher incidences of human cardiovascular and pulmonary diseases [2–4]. Among the growing industries, nickel (Ni) production has increased in particular, due to the use of Ni in many areas of factory production, such as the production of catalysts, energy storage devices, and lithium-ion batteries for electric cars [5]. New Caledonia is the world's third largest Ni producer. Mineral resources are concentrated in ultramafic formations characterized by high concentrations of trace metals, including Ni, chromium (Cr), cobalt (Co), and manganese (Mn) [6,7]. Anthropogenic activities such as open-pit mining and the natural erosion of soils in New Caledonia has led to the atmospheric emission of Ni particles and, in particular, to the emission of nickel oxide nanoparticles (NiONPs) due to the hydrometallurgical process used to extract Ni [8,9]. Previous studies have revealed significant contamination levels in the New Caledonian population and have shown elevated levels of Ni in the lungs of nickel refinery workers [10,11]. Moreover, cardiovascular diseases were found to be more prevalent among those workers [12]. Only a few studies have assessed the risks for workers and the surrounding population, yet the risks of inhaled NiONPs to vulnerable populations suffering from chronic cardiovascular disease have not been documented. However, a study evaluated the effects of inhaled particulate matter of 2.5 μm in diameter ($\text{PM}_{2.5}$) on a population suffering from chronic cardiovascular diseases [13]. NiONPs are potentially more harmful than $\text{PM}_{2.5}$ because of their high surface reactivity, which leads to greater interactions with biological systems [14].

A previous study showed greater lung deposition with inhaled NPs than with larger-sized particles because inhaled NPs are able to accumulate in lung alveoli and in the lung parenchyma near the pulmonary arteries [15]. NPs can efficiently cross the pulmonary epithelial barrier to reach the pulmonary circulation, where they can be in direct contact with the endothelial cells (EC) that line the inner surface of the arteries [1,16]. Any alterations of EC can induce vascular diseases. Indeed, EC are involved in vascular tone regulation, coagulation control, and vascular barrier integrity [17]. Owing to their direct contact with the blood stream, EC are also very vulnerable to mechanical forces such as the shear stress and cyclic stretch (CS) resulting from frictional forces in the blood flow and intraluminal pressure [18,19]. In vivo studies in rodents have shown pulmonary inflammation and pulmonary fibrosis induced by NiONPs [20–22]. Both pulmonary inflammation and fibrosis are known to play a role in cardiovascular diseases [23]. Furthermore, we previously demonstrated, in an in vitro study of EC, that NiONPs trigger significant oxidative stress. This was shown through an overproduction of reactive oxygen species (ROS) associated with a pro-inflammatory response, mitochondrial dysfunction, and calcium signaling alterations [24], all critical events involved in the pathophysiology of cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension (PH) [25,26]. Moreover, our findings suggest that NiONPs interact with mechanosensitive ion channel TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4), which is expressed in vascular cells and is also involved in the remodeling of pulmonary arteries, a major feature of PH [27,28]. We also showed that NiONPs induce an increase in vasoconstrictor mediator endothelin-1 (ET-1) production in EC, which is also involved in PH [29]. Consequently, NiONP accumulation and retention in pulmonary arteries could be a critical factor for the exacerbation of pre-existing cardiovascular diseases, such as PH, which is the main disease of the pulmonary circulation. This disease is characterized by an increase in pulmonary arterial resistance, a remodeling of pulmonary arteries, perivascular inflammation, pulmonary arterial hyper-reactivity with an elevation in pulmonary arterial pressure, right ventricular hypertrophy, and, finally, heart failure leading to premature death [30,31].

Moreover, all the critical events triggered by NiONPs, such as oxidative stress, inflammation, and calcium signaling alterations, are key features of PH pathophysiology. Thus, one can assume that the workers and the population exposed to NiONPs in New Caledonia

may be at risk of exacerbating preexisting cardiovascular diseases such as PH. However, the underlying cellular and molecular mechanisms by which NiONPs alter both calcium signaling and mitochondrial function in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) under pathological conditions have not been reported. In this respect, the objectives of the proposed *in vitro* study are to compare these NiONP-dependent mechanisms in HPAEC cultured under physiological and pathological conditions. These conditions mimic the vascular dynamics and the environment observed in PH [32].

Different endpoints were investigated in both conditions: (i) ROS production was investigated using CM-H₂DCF-DA and MitoSOX probes, (ii) nitrite production by the Griess reaction, (iii) IL-6 secretion by ELISA, (iv) calcium signaling by Fluo-4 AM probe, and (v) mitochondrial dysfunction with TMRM and MitoTracker probes.

2. Materials and Methods

2.1. Human Pulmonary Arterial Endothelial Cell Culture

Human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) obtained from the main branch of the pulmonary artery of a 68-year-old Caucasian female donor (N°451Z031.14) were provided by PromoCell® (Heidelberg, Germany). HPAEC were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) supplemented with Supplement Mix, as recommended by the manufacturer (PromoCell®). Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in 25 cm² culture flasks and were cultured at 37 °C, in 95% humidity and 5% CO₂. Cell passages were conducted when cells were at about 80% confluence. All experiments were conducted on HPAEC from passages 2 to 8.

2.2. Reagents and Chemicals

HPAEC were cultured in ECGM from PromoCell®. The standard physiological salt solution (PSS) was composed of 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg²⁺, and 2 mM Ca²⁺ adjusted to pH = 7.4. Fluo-4-AM green dye (1 μM), MitoSOX™ red dye (5 μM), and Hoechst 33342 blue dye (2 μM) were obtained from Thermo Fischer Scientific, Invitrogen™ (Paris, France).

2.3. NiO Nanoparticles

Nickel (II) oxide nanoparticles (NiONPs) (Cat. No.637130) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). NiONPs partially characterized by the manufacturer have the following physical and chemical characteristics: mean aerodynamic diameter of 50 nm (TEM); density, 6.67 g/mL; purity, 99.8% (trace metal basis); refractive index, 1.331; and viscosity, 0.888 cP. NiONPs were suspended in ECGM at a final concentration of 2 mg/mL and stored at 4 °C until use. Prior to use, stock suspensions were vortexed, sonicated at 3 × 30 s (Vibracell 75186, 130 W, 56–60 Hz), and diluted in ECGM extemporaneously at appropriate concentrations (0.5–5 μg/cm²). The NiONPs were previously characterized by Germande et al., 2022 [24]. The hydrodynamic size distribution of NiONPs suspended in ECGM was determined at a concentration of 5 μg/cm² by dynamic light scattering (DLS) using a VASCO particle-size analyzer from Cordouan Technologies® (Pessac, France). The Zeta potential values of NiONPs were assessed by laser Doppler electrophoresis and a Wallis zeta-potential analyzer from Cordouan Technologies®.

2.4. Acellular ROS Production

Acellular ROS production was assessed using the H₂DCF-DA probe (Fisher Scientific®), as recommended by the manufacturer and using a method adapted from previous studies [33]. The H₂DCF-DA probe was resuspended with a mix of absolute ethanol (final concentration 0.33 mM) and a 10 mM NaOH solution to cleave the diacetate group. After a 30 min activation at room temperature in the dark, the reaction was stopped with 10× PBS. The activated H₂DCF probe was then incorporated (final concentration 16.5 μM) with NiONPs (0–50 μg/mL). Finally, the plate was incubated for 60 min at 37 °C and 5% CO₂. Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at 485/520 nm (excitation/emission)

by using the FLUOstar Omega 2.10 plate reader, and the analyses were performed with MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech[®], Ortenberg, Germany).

2.5. Cyclic Stretch

After 48 h of culture in flexible silicon chambers, cells were placed under either static and normoxic conditions (21% O₂, 37 °C, and 5% CO₂) or under 20% cyclic stretch (CS) (1 Hz frequency) and hypoxic conditions (1% O₂, 37 °C, and 5% CO₂) for 20 h using a STREX[®] system ST-140-10 (B-bridge international, Santa Clara, CA, USA). After 20 h, cells and supernatants were collected.

2.6. Nanoparticle Exposure

After 20 h of culture in both physiological (static cells in normoxia) and pathological (20% CS in hypoxia) conditions, cells were treated with NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 4 h or 24 h. These different durations of HPAEC exposure to NiONPs were chosen according to various kinetic studies which showed a peak in ERO production after 4 h of exposure of HPAEC to NiONPs and peaks in IL-6 and nitrite secretion after 24 h of exposure of cells to NPs (results not shown). Supernatants or cells were then collected to perform the experiments. The NiONP working concentrations for all experiments (for which the rate of mortality was under 30%) were all determined previously with the WST-1 assay test [24].

2.7. Oxidative Stress

Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. Cells were then exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 4 h.

2.7.1. Global Reactive Oxygen Species Production

Intracellular ROS production was performed using the CM-H₂DCF-DA probe (Fisher Scientific[®]), as recommended by the manufacturer and using a method adapted from previous studies [33]. Cells were rinsed with ECGM without serum and were pre-incubated for 20 min with CM-H₂DCF-DA probe (final concentration 20 µM) before a 4 h exposure to NiONPs. Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at 485/520 nm (excitation/emission) by using the FLUOstar Omega 2.10 plate reader (BMG Labtech[®], Champigny s/Marne, France), and the analyses were performed with MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech[®]).

2.7.2. Mitochondrial O₂⁻ production

Mitochondrial superoxide anion (O₂⁻) formation was performed using MitoSox[™] red dye (ThermoFischer[®]), as recommended by the manufacturer by confocal microscopy (TE 2000, Nikon). After a 4 h exposure to NiONPs, cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark) with MitoSox probe in PSS. The MitoSox probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). Fluorescence intensity was measured for MitoSox at 543/605 nm and Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). The silicon chambers were observed at 40× magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon, Tokyo, Japan). For each experiment, 20–30 cells were analyzed per well. MitoSox fluorescence intensity was proportional to the rate of probe oxidation. Analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2016 (Redmond, WA, USA).

2.8. Nitric Oxide Metabolite Production: Nitrites

Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. Cells were then exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 24 h. The presence of nitrite products was determined in HPAEC supernatants with Griess reagent (Sigma-Aldrich[®]), as recommended by the manufacturer. After a 24 h exposure to NiONPs, the supernatants were removed, collected, and centrifuged at 10,000× g for 10 min at 4 °C. Then, the supernatants were analyzed as recommended by the manufacturer's

guidelines and the absorbance was measured at 540 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®).

2.9. Pro-Inflammation Effect: Cytokine IL-6 Production

The level of pro-inflammatory interleukin-6 (IL-6) in supernatants was assessed and analyzed using an ELISA kit (Human IL-6 DuoSet® ELISA R&D Systems, Minneapolis, MA, USA). Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. Cells were washed with the culture medium and exposed to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) for 24 h. Supernatants were then removed, centrifuged at 10,000× g for 10 min at 4 °C, and analyzed as recommended by the manufacturer. The absorbance was determined at 450 nm, corrected at 570 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano 2.10, BMG Labtech®).

2.10. Cytoplasmic Calcium Measurement

Variations in intracellular calcium [Ca²⁺]_c were detected using the Fluo-4 AM green dye, as recommended by the manufacturer's guidelines. Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. After a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²), cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark) with the Fluo-4 AM probe in PSS. Fluo-4-AM probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The silicon chambers were observed at 40× magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity was determined for Fluo-4 AM at 488/515 nm and for Hoechst 33342 at 408/450 nm (excitation/emission). For each experiment, 20–30 cells were analyzed per well. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.11. Mitochondrial Activity

2.11.1. Mitochondrial Membrane Potential Measurement

The mitochondrial membrane potential (Ψ_{MP}) was measured by confocal microscopy, using TMRM red dye (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate, ThermoFischer) as recommended by the manufacturer's guidelines. Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. After a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²), cells were incubated for 20 min (37 °C, in the dark) with a TMRM fluorescent probe in PSS. The TMRM probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The silicon chambers were observed at 40× magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). The Fluorescence intensity was then determined at 543/605 nm (excitation/emission). For each experiment, 20–30 cells were analyzed per well. The analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.11.2. Mitochondrial Mass

The mitochondrial mass was measured by confocal microscopy using the MitoTracker green dye (ThermoFischer) as recommended by the manufacturer's guidelines. Cells were cultured at 20,000 cells/cm² and maintained for 48 h in both physiological and pathological conditions. After a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²), cells were incubated for 30 min (37 °C, in the dark) with the MitoTracker probe in PSS. The MitoTracker probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoechst 33342). The silicon chambers were observed at 40× magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). The Fluorescence intensity was determined at 408/450 nm (excitation/emission). For each experiment, 20–30 cells were analyzed per well. The analyses were performed using the NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel.

2.12. Statistical Analysis

Every experimental condition was independently repeated several times (n indicates the number of experiments) and for all independent experiments, 3–8 wells per condition were conducted. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) for n independent experiments. Statistical tests were assessed using analysis of variance: one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons ($n > 30$) and by Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test ($n < 30$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$ between both conditions). All data were analyzed with GraphPad PRISM software. p values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Acellular ROS Production and Morphological Study of HPAEC in Physiological and Pathological Conditions

3.1.1. Acellular ROS Production in Cell Medium

In acellular conditions, NiONPs were able to induce ROS generation in the culture medium. We observed from 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a significant concentration-dependent increase in global ROS production as compared to controls, i.e., medium without NiONPs (122.85%, *** $p < 0.001$) (Figure 1a).

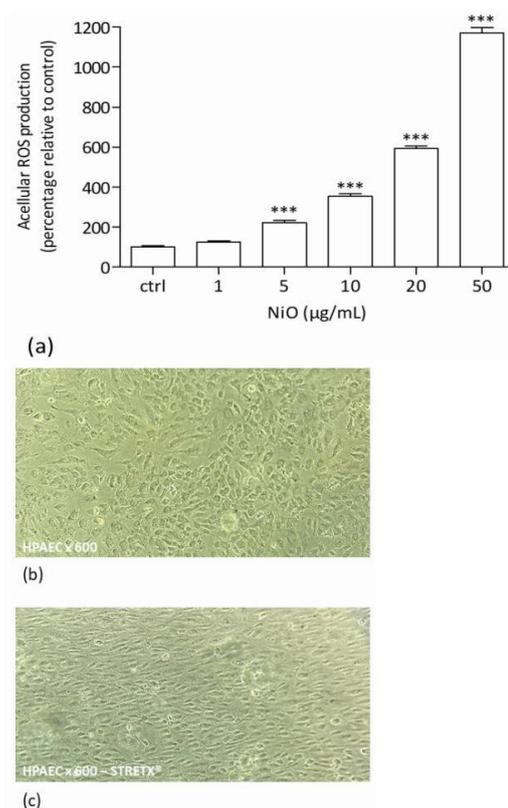


Figure 1. (a) Acellular NiONP ROS production measured by spectrofluorimetry with the H2DCF-DA probe. The results were expressed as the H2DCF probe fluorescence intensity relative to controls (medium without NiONPs). *** $p < 0.001$ vs. control according to Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. (b,c) HPAEC after 20 h of culture, either under physiological or pathological conditions, observed by phase contrast microscopy (PCM) at 600 \times magnification. (b) Untreated cells under static conditions in normoxia. (c) Untreated cells under 20% CS in hypoxia.

3.1.2. Morphological Study of HPAEC

HPAEC were first observed by phase contrast microscopy (PCM). Microscopic images were obtained after 20 h under physiological and pathological conditions. The representative images shown in Figure 1b,c demonstrate that the morphology of cells cultured under 20% CS was more elongated as compared to static cultured cells.

3.2. NiONP-Induced Oxidative Stress under Physiological and Pathological Conditions

To investigate how CS and hypoxia modulate ROS production, measurements of global ROS and mitochondrial O_2^- production were performed.

3.2.1. Cytoplasmic ROS Production

After a 4 h exposure of HPAEC to NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) under physiological conditions, we observed from $2.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a significant concentration-dependent increase in global ROS production as compared to untreated cells (132.29%, # $p < 0.05$). Similarly, under pathological conditions, global ROS production was also significantly higher in a concentration-dependent pattern, but from $0.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, as compared to untreated cells (132.08%, *** $p < 0.001$). However, under pathological conditions, for the highest NiONP concentration, global ROS production was significantly increased as compared to treated cells under physiological conditions (135.21% vs. 153.57%, \$\$ $p < 0.01$), demonstrating that ROS production induced by NiONP exposure was higher under pathological conditions than under physiological ones (Figure 2).

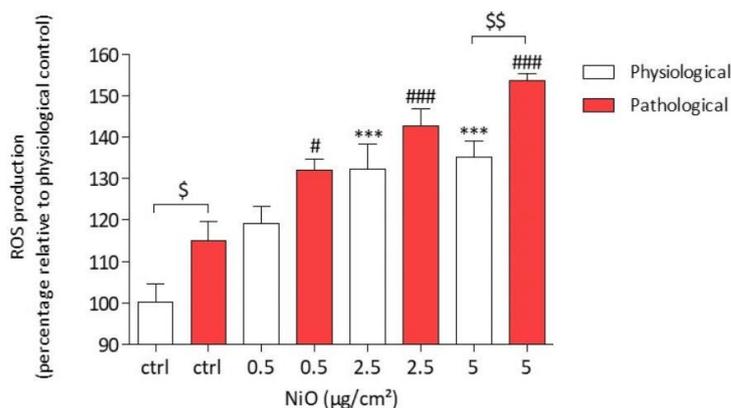
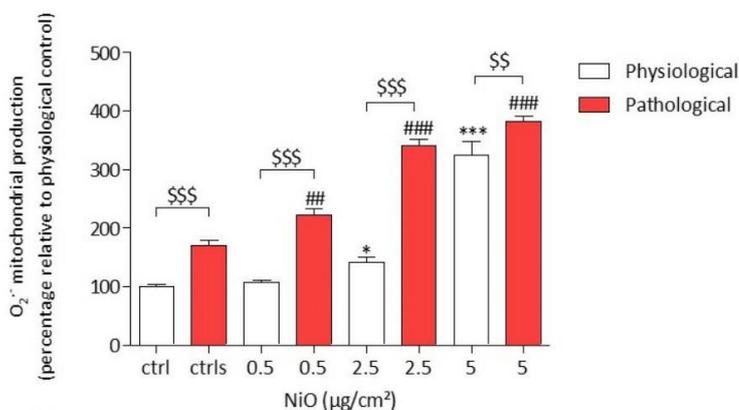


Figure 2. ROS production in HPAEC after a 4 h exposure to NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) under physiological and pathological conditions, as measured by spectrofluorimetry with the $\text{CMH}_2\text{DCF-DA}$ probe. The results were expressed as the percentage of CMH_2DCF probe fluorescence intensity relative to physiological controls. Data were mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$) performed in quadruplicate. *** $p < 0.001$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$ $p < 0.05$ and \$\$ $p < 0.01$ between both conditions. According to Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test.

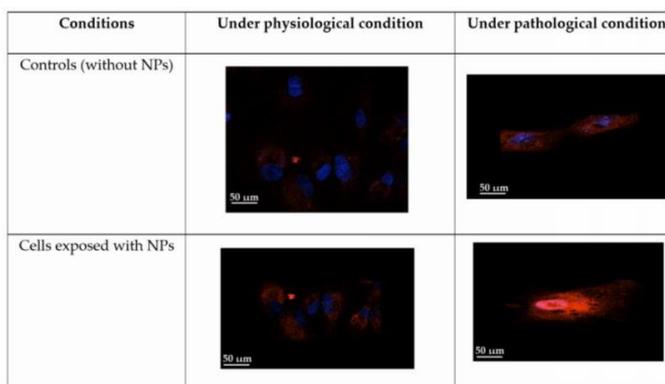
3.2.2. Mitochondrial O_2^- Production

After a 4 h exposure of HPAEC to NiONPs ($0.5\text{--}5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant concentration-dependent increase in mitochondrial O_2^- production at the two highest concentrations under physiological conditions (142.45% * $p < 0.05$ and 324.71% *** $p < 0.001$) and from $0.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (222.35% ## $p < 0.01$) under pathological conditions as compared to untreated physiological cells, respectively (Figure 3a,b). Moreover, under pathological conditions, mitochondrial O_2^- production was significantly increased as compared to untreated physiological cells (101% vs. 170.09% \$\$\$ $p < 0.001$). Furthermore, under pathological conditions, for all the concentrations, mitochondrial O_2^- production was significantly increased in response to NiONPs as compared to treated cells in physiological

conditions (\$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$). Figure 3b shows HPAEC under physiological or pathological conditions after NiONP exposure or not.



(a)



(b)

Figure 3. Mitochondrial O₂⁻ production in HPAEC after a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) under physiological and pathological conditions, measured by confocal microscopy. (a) The values were normalized to the untreated physiological cells and results were expressed as the percentage of the MitoSox probe fluorescence intensity relative to the control cells. (b) HPAEC observed by confocal microscopy at focus 60×, under physiological and pathological conditions, without or with NiONPs (2.5 µg/cm²), with mitochondria marked in red, with MitoSox probe and nucleus in blue, with Hoechst probe. Data were mean ± SEM of three independent experiments ($n = 3$) performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. # $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$ between both conditions. According to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons.

These results thus provide evidence that mitochondrial O₂⁻ production was higher under pathological conditions after NiONP exposure as compared to physiological ones.

3.3. NiONP-Induced Nitrites Production under Physiological and Pathological Conditions

We have previously shown that after a 4 h exposure, NiONPs are able to increase intracellular O₂⁻ production in HPAEC. Since NO can be oxidized by O₂⁻ to form NO metabolites such as peroxynitrites (ONOO⁻), the production of nitrites was investigated as a marker of NO metabolites. The production of nitrites was measured using the Griess reaction. After a 24 h exposure of HPAEC to NiONPs (0.5–5 µg/cm²) under physiological conditions, a significant increase in nitrite production was observed at the highest con-

centration (0.18 ng/ μ L, * $p < 0.05$) as compared to untreated cells (0.09 ng/ μ L). Similarly, under pathological conditions, NiONPs induced a significant increase in nitrite production at 5 μ g/cm², as compared to untreated cells (0.32 ng/ μ L, # $p < 0.05$ and 0.20 ng/ μ L, respectively).

Interestingly, at the three NiONP concentrations, the production of nitrites under pathological conditions was significantly higher than for cells under physiological conditions (\$\$ $p < 0.01$) (Figure 4).

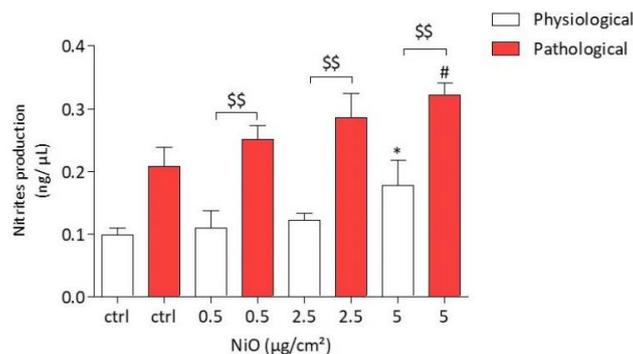


Figure 4. Nitrite production in HPAEC after a 24 h exposure to NiONPs (0.5–5 μ g/cm²) under physiological and pathological conditions, measured by Griess reaction. The results were expressed as ng/ μ L in the supernatant. Data are mean \pm SEM of five independent experiments ($n = 5$) performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. # $p < 0.05$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$\$ $p < 0.01$ between both conditions. According to Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test.

3.4. NiONP-Induced IL-6 Secretion under Physiological and Pathological Conditions

The IL-6 secretion was measured in HPAEC by ELISA assay. After a 24 h exposure of HPAEC to NiONPs (0.5–5 μ g/cm²), the results showed, at 5 μ g/cm², a significant increase in IL-6 production under both physiological and pathological conditions (191.74 pg/mg of proteins * $p < 0.05$ and 355.14 pg/mg of proteins ## $p < 0.01$, respectively) as compared to untreated cells (124.17 pg/mg of proteins and 141.96 pg/mg, respectively) (Figure 5). Interestingly, at the highest concentration, 5 μ g/cm², the secretion of IL-6 under pathological conditions was larger than that in physiological conditions (\$ $p < 0.05$).

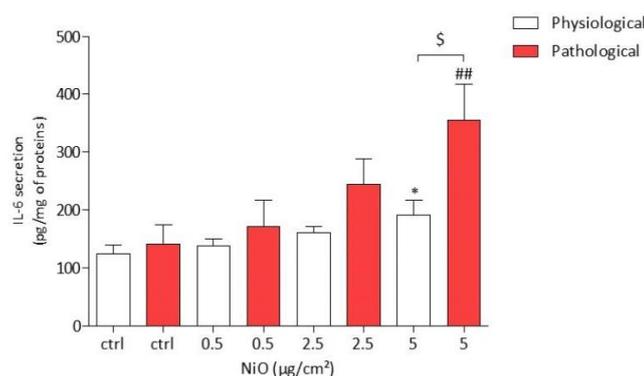
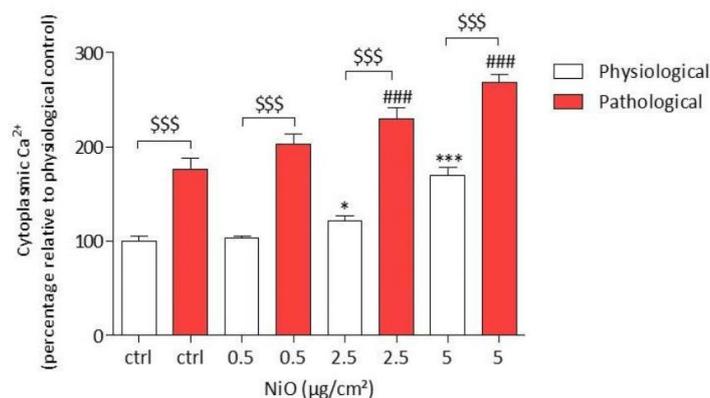


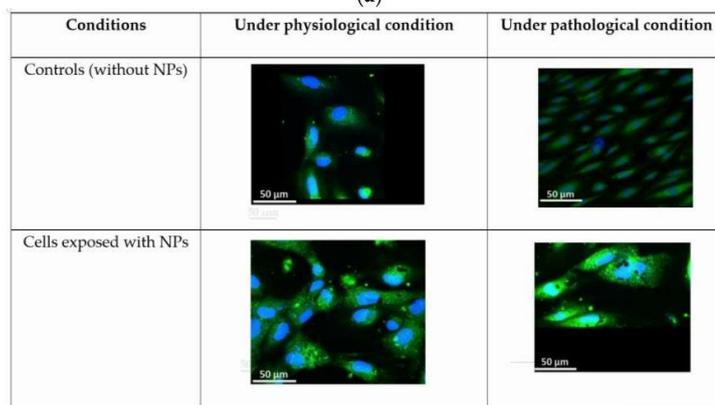
Figure 5. IL-6 production in HPAEC after a 24 h exposure to NiONPs (0.5–5 μ g/cm²) under physiological and pathological conditions measured by ELISA. The results were expressed as pg/mg of protein. Data are mean \pm SEM of five independent experiments ($n = 5$) performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. ## $p < 0.01$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$ $p < 0.05$ between both conditions. According to Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test.

3.5. NiONP-Induced Cytoplasmic Calcium Level Alteration under Physiological and Pathological Conditions

Variations in cytoplasmic calcium $[Ca^{2+}]_c$ were measured in HPAEC. After a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), calcium imaging was assessed with Fluo-4 AM probe. The results showed a significant increase in cytoplasmic calcium levels from 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (121.53% * $p < 0.05$ and 230.06% ### $p < 0.001$) for both physiological and pathological conditions as compared to untreated cells (102.01% and 175.99%, respectively) (Figure 6a,b). Moreover, under pathological conditions, NiONPs-induced increase in basal $[Ca^{2+}]_c$ was higher than in physiological conditions whatever the concentration (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (\$\$\$ $p < 0.001$). Figure 6b shows HPAEC under physiological or pathological conditions after NiONPs exposition or not.



(a)

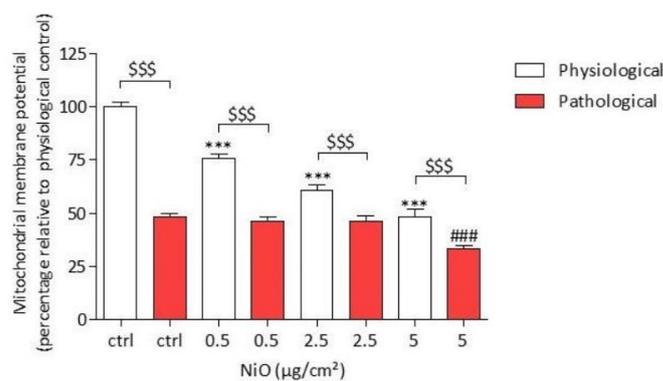


(b)

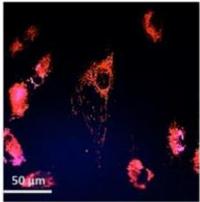
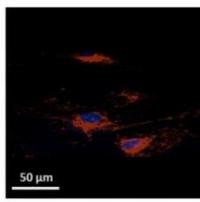
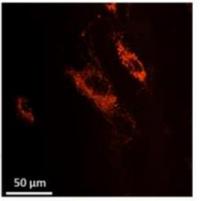
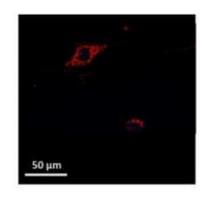
Figure 6. Resting $[Ca^{2+}]_c$ in HPAEC cells after a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in physiological and pathological conditions, measured with Fluo-4 probe (1 μM) by confocal microscopy. (a) The values were normalized to the untreated physiological cells and results were expressed as the percentage of the Fluo-4-AM probe fluorescence intensity relative to the physiological controls. (b) HPAEC observed by confocal microscopy at focus $\times 60$, under physiological and pathological conditions, without or with NiONPs (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), with cytoplasmic calcium marked in green with Fluo-4-AM probe and nucleus in blue with Hoechst probe. Data were mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$) performed in quadruplicate. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. ### $p < 0.001$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$\$\$ $p < 0.001$ between both conditions. According to one-way ANOVA followed by Tukey's post-test for multiple comparisons.

3.6. NiONPs-Induced Mitochondria Alterations under Physiological and Pathological Conditions
 3.6.1. The Mitochondrial Membrane Potential

After a 4 h exposure of HPAEC to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant concentration-dependent decreased in the TMRM probe fluorescence resulting in a loss of mitochondrial membrane potential (ΨMP) in both physiological and pathological conditions as compared to untreated cells (Figure 7a,b). Under pathological conditions the loss of ΨMP was significantly observed only at 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (33.43% $\#\# p < 0.01$) and from the lowest concentrations in physiological conditions (75.57% $*** p < 0.001$ at 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as compared to untreated cells (99.99% under physiological conditions and 48.16% in pathological condition). Furthermore, under pathological conditions, a loss of ΨMP was significantly observed as compared to cells under physiological conditions ($$$$ p < 0.001$) for both treated and untreated cells. Figure 7b shows HPAEC under physiological or pathological conditions after NiONP exposure or not.

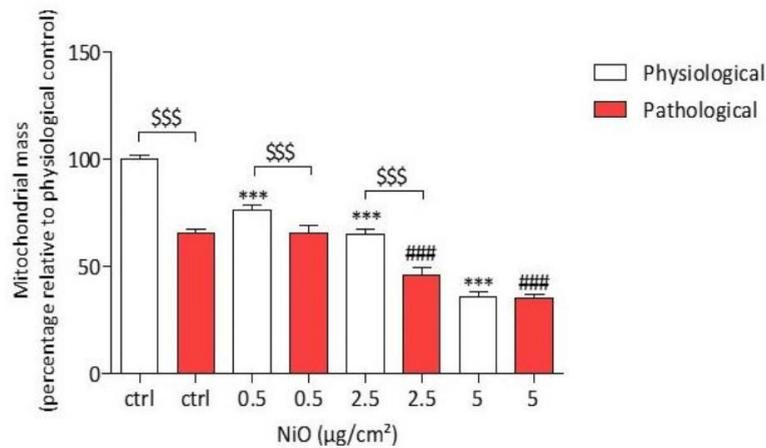


(a)

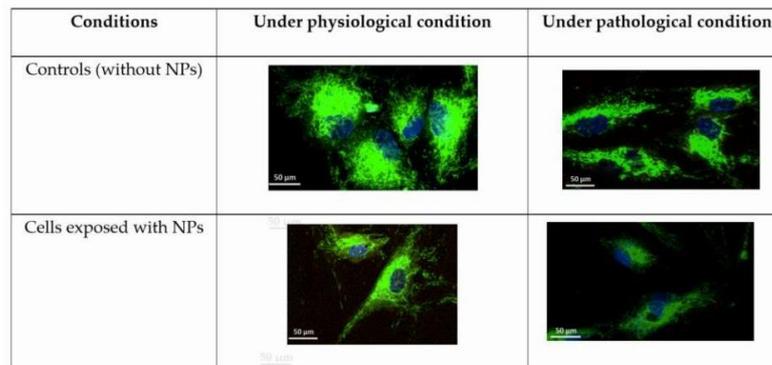
Conditions	Under physiological condition	Under pathological condition
Controls (without NPs)		
Cells exposed with NPs		

(b)

Figure 7. Cont.



(c)



(d)

Figure 7. (a) Ψ MP in HPAEC after a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in physiological and pathological conditions was measured with TMRM probe (100 nM) by confocal microscopy. (b) HPAEC observed by confocal microscopy at focus 60 \times , under physiological and pathological conditions, without or with NiONPs (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), with Ψ MP marked in red with TMRM probe and nucleus in blue with Hoechst probe. (c) Mitochondrial mass in HPAEC after a 4 h exposure to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in physiological and pathological conditions was measured with MitoTracker probe (1 μM) by confocal microscopy. The values were normalized to the untreated physiological cells and results were expressed as the fold change of the probes fluorescence intensity relative to the control cells. (d) HPAEC observed by confocal microscopy at focus 60 \times , under physiological and pathological conditions, without or with NiONPs (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), with mitochondrial mass marked in green with MitoTracker probe and nucleus in blue with Hoechst probe. Data were mean \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$) performed in quadruplicate. *** $p < 0.001$ vs. untreated cells in 0% CS in normoxic conditions. ### $p < 0.001$ vs. untreated cells in pathological conditions. \$\$\$ $p < 0.001$ between both conditions. According to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons.

3.6.2. The Mitochondrial Mass

After a 4 h exposure of HPAEC to NiONPs (0.5–5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), we observed a significant concentration-dependent decrease of mitochondrial mass in both physiological and pathological conditions as compared to untreated cells (Figure 7c,d), from 0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (76.20% *** $p < 0.001$) in physiological conditions and from 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (46.10% ## $p < 0.01$)

in pathological conditions. Moreover, under pathological conditions mitochondrial mass significantly decreased as compared to cells under physiological conditions in untreated cells (65.30% vs. 100.01%, respectively) and at the two lowest NiONP concentrations (\$\$\$ $p < 0.001$). Figure 7d shows HPAEC under physiological or pathological conditions after NiONP exposure or not.

4. Discussion

Nickel production in New Caledonia, resulting from mining activities, releases NiONPs into the atmosphere, which could affect the health of workers and surrounding populations, especially those affected by a pre-existing cardiovascular disease. Indeed, it is well known that NPs can induce adverse effects in vascular reactivity, blood pressure, and endothelial function, which in turn leads to endothelial dysfunction and cardiovascular diseases [34,35]. Patients suffering from vascular disease such as PH could be at risk because pulmonary circulation, and especially ECs, are possible primary targets of inhaled NPs [36]. EC are subjected to hemodynamic forces, including shear stress and CS, which are increased in pulmonary arteries affected by PH [37]. Moreover, previous studies have shown that ECs are exposed to hypoxia, leading to endothelial dysfunction in hypoxemic PH [38]. Our study focused on oxidative stress, nitrite production, inflammation, calcium homeostasis, and mitochondrial function because many studies have shown that these factors are involved in the development and the progression of cardiovascular diseases such as PH [39] and altered in pulmonary cells exposed to NPs [40–42].

In this context, we aimed to evaluate whether NiONP exposure could aggravate vascular diseases such as PH. In an *in vitro* study, we compared the toxic effects of NiONPs in pulmonary vascular cells under physiological and pathological conditions. These conditions mimic the vascular dynamics and environment observed in PH, i.e., hypoxia and 20% CS. In a previous study, we showed that this experimental *in vitro* model closely reproduces *in vivo* PH events such as endothelial failure [32].

First, we showed that, in acellular conditions, ROS were generated in the culture medium by NiONPs, mainly due to their high surface reactivity. These results are in line with the literature [43]. The cytotoxicity of metal oxide NPs could therefore be due, in part, to the overproduction of ROS, and to their high surface reactivity [44,45]. Moreover, transition metals such as Ni are known to produce ROS such as O_2^- via the Fenton reaction [46].

Dysregulation of the redox system disrupts the cellular signaling pathways involved in the development and progression of pulmonary vascular diseases. In addition, as EC are subjected to mechanical forces, they can react to these forces by changing their redox state, leading to pathophysiological consequences. Thus, any factor, such as NP exposure, that disrupts the redox system can therefore contribute to the aggravation or development of vascular diseases [47]. Oxidative stress is therefore a major event implicated in the pathophysiology of PH and in the vascular effects induced by NPs [48]. In the present study, we first demonstrated that a higher ROS production was observed in HPAEC under pathological conditions as compared to cells under physiological conditions. These results are in line with previous studies showing that hypoxia induces ROS production and endothelial dysfunction [30–32]. In addition, we showed that NiONP exposure significantly increased global ROS and mitochondrial O_2^- production as compared to control cells. These results are in line with previously published data regarding NiONP exposure [24]. However, in cells exposed to NiONPs under pathological conditions, the increase in ROS and mitochondrial O_2^- production was greater than in HPAEC under physiological conditions. These results suggest that the combination of both pathological conditions and NiONP exposure can result in higher oxidative stress, and can therefore lead to more severe endothelium damage.

It is well known that once ROS are produced, the unstable O_2^- , can react with the nitrous oxide (NO), an important vasculoprotective factor, to form reactive metabolites such as peroxynitrites and nitrites, toxic molecules implicated in endothelial dysfunction [49].

In a previous study, we showed that NiONPs induced a decrease in NO production in HPAEC [24] that could be explained by this rapid kinetic reaction between NO and O_2^- leading to alterations of in vascular reactivity, one of the critical events observed in cardiovascular diseases, including PH [50,51]. Consequently, the production of nitrites, which reflects the peroxynitrites production, was analyzed. In the present study, NiONPs significantly increased, at the highest concentration, nitrite production in both physiological and pathological conditions. Moreover, in cells exposed to NiONPs under pathological conditions, the increase in nitrite production was greater than in HPAEC under physiological conditions, confirming the amplification of the toxic effects induced by NiONPs. These results are in line with previous studies showing a decrease in NO bioavailability associated with nitrite production under pathological conditions [52].

In view of the link between NP-induced oxidative stress and inflammation and the involvement of inflammation in the pathophysiology of PH [53], we also evaluated the effect of NiONPs on IL-6 secretion in physiological and pathological conditions. Indeed, it has been demonstrated both in vivo and in vitro that many metal oxide NPs induce ROS production, which could in turn activate inflammatory pathways via the secretion of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, [54]. IL-6 is a cytokine known to be involved in PH [55]. Our results showed that in NiONP-treated cells, IL-6 secretion is significantly higher when cells are cultured with 20% CS in hypoxia as compared to cells under physiological conditions. The increase in IL-6 secretion may reflect the pro-inflammatory response that can be found in PH [56].

Given the importance of calcium signaling in endothelial dysfunction, we also evaluated the effect of NiONP exposure on calcium signaling in physiological and pathological conditions. In a previous study, we demonstrated that NiONP-induced calcium homeostasis alterations may originate from oxidative stress [24]. Our findings suggested that calcium signaling alterations were partly due to both interaction and inactivation of TRPV4 calcium channels by NiONPs, which are known to have a major role in PH [57]. In the present study, it was observed that NiONPs increased basal variation $[Ca^{2+}]_c$ in HPAEC under both conditions. The present results are in line with those found in our previous study under physiological conditions [24]. In pathological conditions, it was observed that NiONPs induced basal cytoplasmic calcium release to a greater extent under pathological conditions as compared to physiological conditions, confirming a potential exposure risk for these NiONPs for populations that suffer from endothelial dysfunction.

All these results are in agreement with previous data showing that smaller and non-metallic, black carbon NPs induced endothelial dysfunction in HPAEC cultured on the same pathological model. This was characterized by an overproduction of ROS and nitrites, a secretion of pro-inflammatory IL-6 cytokine, and an alteration in calcium homeostasis [32].

In a previous study, we showed in HPAEC that NiONPs were rapidly internalized in the cytoplasm into vesicles to form aggregates which were detected very close to mitochondria, suggesting that they may be able to interfere with mitochondrial functions [24]. Moreover, in the current study, we demonstrated that NiONP exposure induced an overproduction of mitochondrial O_2^- . Li et al. [58] also showed that exposure to metal NPs (silver NPs) can alter mitochondria in relation to intracellular calcium influx, leading to pulmonary damage. Mitochondrial function is another important event involved in both vascular diseases and in NP-induced toxicity. Mitochondria are known to provide energy required by cells (ATP) to control apoptosis, to participate in calcium regulation, and in ROS production [59]. Moreover, mitochondrial alterations have also been evidenced in pulmonary arteries in PH [60]. Metal exposure, such as cadmium exposure, induces a decrease in ATP production and an increase in ROS production, resulting in epigenetic modifications and leading to mitochondrial dysfunction associated with the development or aggravation of PH [61]. Mitochondrial O_2^- production might induce a mitochondrial membrane lipoperoxidation, disrupt the Ψ MP and activate apoptosis [62]. Previous studies also reported that mitochondrial impairment may contribute to endothelial dysfunction and cardiovascular diseases [63,64]. Finally, we previously demonstrated that NiONPs

can activate the apoptosis pathway. Consequently, in the present study, we evaluated the NiONPs effect on mitochondrial function, i.e., ΨMP and mitochondrial mass in both conditions. Our results showed that without NiONPs, mitochondria had more impaired function under pathological conditions with an excessive loss of ΨMP and a decreased in mitochondrial mass, which could also exacerbate PH. In cells under pathological conditions, insignificant amplification of the alteration in both ΨMP and mitochondrial mass after NiONPs exposure was observed as compared to cells under physiological conditions. These results do not seem surprising, since without NiONPs, in cells under pathological conditions mitochondria were already greatly altered in this model mimicking PH. Abnormal mitochondrial dynamics could be an early marker of PH and monitor disease progression [65]. Furthermore, the change in mitochondrial mass would play an important role in controlling the apoptosis pathway via caspase activation and could thus generate cancer cells [66].

In recent years, particular attention has been paid to co-morbidities in order to investigate the factors contributing to pulmonary and cardiovascular disease exacerbations, such as chronic obstructive pulmonary disease and PH [67]. The present study provides evidence that NiONPs-induced toxic effects are strengthened under pathological conditions that mimic the endothelial dysfunction observed in PH. These data could suggest that workers and other populations inhaling NiONPs and with pre-existing cardiovascular pathology are more susceptible to aggravating their disease.

5. Conclusions

The present study shows that, under pathological conditions, NiONPs induce oxidative stress, inflammation, calcium alterations, and mitochondrial dysfunction, as well as significant nitrite production. All these effects are enhanced under pathological conditions as compared to physiological ones. Therefore, it can be assumed that workers and the populations exposed to NiONPs are at risk of exacerbating pre-existing vascular disease.

Author Contributions: O.G.: conceptualization, formal analysis, methodology, visualization, writing—original draft; T.D.: methodology, writing—review and editing; J.-F.Q.: writing—review and editing; J.D.: methodology, writing—review and editing; V.F.-M.: writing—review and editing; M.-H.E.: writing—review and editing; G.C.: writing—review and editing; P.V.: writing—review and editing; B.M.: writing—review and editing; P.B.: writing—review and editing; C.G.: writing—review and editing; M.B.: project administration, conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, validation, writing—review and editing; I.B.: project administration, conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, validation, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Miller, M.R.; Raftis, J.B.; Langrish, J.P.; McLean, S.G.; Samutrtai, P.; Connell, S.P.; Wilson, S.; Vesey, A.T.; Fokkens, P.H.B.; Boere, A.J.F.; et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano* **2017**, *11*, 4542–4552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mills, N.L.; Donaldson, K.; Hadoke, P.W.; Boon, N.A.; MacNee, W.; Cassee, F.R.; Sandstrom, T.; Blomberg, A.; Newby, D.E. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2009**, *6*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Schulz, H.; Harder, V.; Ibaldo-Mulli, A.; Khandoga, A.; Koenig, W.; Krombach, F.; Radekewicz, R.; Stampfl, A.; Thorand, B.; Peters, A. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J. Aerosol Med. Off. J. Int. Soc. Aerosols Med.* **2005**, *18*, 1–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Oberdorster, G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2001**, *74*, 1–8. [[CrossRef](#)]

5. Imran Din, M.; Rani, A. Recent Advances in the Synthesis and Stabilization of Nickel and Nickel Oxide Nanoparticles: A Green Adeptness. *Int. J. Anal. Chem.* **2016**, *2016*, 3512145. [[CrossRef](#)]
6. Losfeld, G.; L'Huillier, L.; Fogliani, B.; Jaffre, T.; Grison, C. Mining in New Caledonia: Environmental stakes and restoration opportunities. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 5592–5607. [[CrossRef](#)]
7. Isnard, S.; L'Huillier, L.; Rigault, F.; Jaffré, T. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* **2016**, *403*, 53–76. [[CrossRef](#)]
8. Pasquet, C.; Monna, F.; van Oort, F.; Gunkel-Grillon, P.; Laporte-Magoni, C.; Losno, R.; Chateau, C. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* **2018**, *190*, 638. [[CrossRef](#)]
9. Yokel, R.A.; Lasley, S.M.; Dorman, D.C. The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health Part B Crit. Rev.* **2006**, *9*, 63–85. [[CrossRef](#)]
10. Andersen, I.; Svenes, K.B. Determination of nickel in lung specimens of thirty-nine autopsied nickel workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1989**, *61*, 289–295. [[CrossRef](#)]
11. St-Jean, A.; Barguil, Y.; Dominique, Y.; Le Bot, B.; Ayotte, P.; Cordier, S. Nickel and associated metals in New Caledonia: Exposure levels and their determinants. *Environ. Int.* **2018**, *118*, 106–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Norseth, T. Environmental pollution around nickel smelters in the Kola Peninsula (Russia). *Sci. Total Environ.* **1994**, *148*, 103–108. [[CrossRef](#)]
13. McCormack, M.C.; Mathai, S.C. A crossroads between the heart and lungs: Air pollution and pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1900654. [[CrossRef](#)]
14. Oberdorster, G.; Maynard, A.; Donaldson, K.; Castranova, V.; Fitzpatrick, J.; Ausman, K.; Carter, J.; Karn, B.; Kreyling, W.; Lai, D.; et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. *Part. Fibre Toxicol.* **2005**, *2*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Horemans, B.; Van Holsbeke, C.; Vos, W.; Darchuk, L.; Novakovic, V.; Fontan, A.C.; De Backer, J.; Van Grieken, R.; De Backer, W.; De Wael, K. Particle deposition in airways of chronic respiratory patients exposed to an urban aerosol. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 12162–12169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nemmar, A.; Hoet, P.H.; Vanquickenborne, B.; Dinsdale, D.; Thomeer, M.; Hoylaerts, M.F.; Vanbilloen, H.; Mortelmans, L.; Nemery, B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **2002**, *105*, 411–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sandow, S.L.; Senadheera, S.; Grayson, T.H.; Welsh, D.G.; Murphy, T.V. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *740*, 811–831. [[CrossRef](#)]
18. Ando, J.; Yamamoto, K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1389–1403. [[CrossRef](#)]
19. Barbeau, S.; Gilbert, G.; Cardouat, G.; Baudrimont, I.; Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Marthan, R.; Vacher, P.; Quignard, J.F.; Ducret, T. Mechanosensitivity in Pulmonary Circulation: Pathophysiological Relevance of Stretch-Activated Channels in Pulmonary Hypertension. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1389. [[CrossRef](#)]
20. Senoh, H.; Kano, H.; Suzuki, M.; Ohnishi, M.; Kondo, H.; Takanobu, K.; Umeda, Y.; Aiso, S.; Fukushima, S. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J. Occup. Health* **2017**, *59*, 112–121. [[CrossRef](#)]
21. Chang, X.H.; Zhu, A.; Liu, F.F.; Zou, L.Y.; Su, L.; Liu, S.K.; Zhou, H.H.; Sun, Y.Y.; Han, A.J.; Sun, Y.F.; et al. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF- β 1 activation in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **2017**, *36*, 802–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mo, Y.; Jiang, M.; Zhang, Y.; Wan, R.; Li, J.; Zhong, C.J.; Li, H.; Tang, S.; Zhang, Q. Comparative mouse lung injury by nickel nanoparticles with differential surface modification. *J. Nanobiotechnol.* **2019**, *17*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rafikova, O.; Al Ghoul, I.; Rafikov, R. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *31*, 933–953. [[CrossRef](#)]
24. Germande, O.; Baudrimont, M.; Beaufile, F.; Freund-Michel, V.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Errera, M.H.; Lacomme, S.; Gontier, E.; Mornet, S.; et al. NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption. *Nanotoxicology* **2022**, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Guibert, C.; Marthan, R.; Savineau, J.P. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 2443–2455. [[CrossRef](#)]
26. Lai, N.; Lu, W.; Wang, J. Ca²⁺ and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 1081–1092.
27. Parpaite, T.; Cardouat, G.; Mauroux, M.; Gillibert-Duplantier, J.; Robillard, P.; Quignard, J.F.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Ducret, T. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* **2016**, *468*, 111–130. [[CrossRef](#)]
28. Cussac, L.A.; Cardouat, G.; Tiruchellvam Pillai, N.; Campagnac, M.; Robillard, P.; Montillaud, A.; Guibert, C.; Gailly, P.; Marthan, R.; Quignard, J.F.; et al. TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *318*, L135–L146. [[CrossRef](#)]

29. Giaid, A.; Yanagisawa, M.; Langleben, D.; Michel, R.P.; Levy, R.; Shennib, H.; Kimura, S.; Masaki, T.; Duguid, W.P.; Stewart, D.J. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1732–1739. [[CrossRef](#)]
30. Freund-Michel, V.; Guibert, C.; Dubois, M.; Courtois, A.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Muller, B. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **2013**, *7*, 175–200. [[CrossRef](#)]
31. Suresh, K.; Shimoda, L.A. Endothelial Cell Reactive Oxygen Species and Ca²⁺ Signaling in Pulmonary Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *967*, 299–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Deweirdt, J.; Ducret, T.; Quignard, J.F.; Freund-Michel, V.; Lacomme, S.; Gontier, E.; Muller, B.; Marthan, R.; Guibert, C.; Baudrimont, I. Effects of FW2 Nanoparticles Toxicity in a New In Vitro Pulmonary Vascular Cells Model Mimicking Endothelial Dysfunction. *Cardiovasc. Toxicol.* **2021**, *22*, 14–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L.; Wang, Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 587–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nemmar, A.; Hoylaerts, M.F.; Hoet, P.H.; Nemery, B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: Systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol. Lett.* **2004**, *149*, 243–253. [[CrossRef](#)]
35. Donaldson, K.; Duffin, R.; Langrish, J.P.; Miller, M.R.; Mills, N.L.; Poland, C.A.; Raftis, J.; Shah, A.; Shaw, C.A.; Newby, D.E. Nanoparticles and the cardiovascular system: A critical review. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 403–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nemmar, A.; Holme, J.A.; Rosas, I.; Schwarze, P.E.; Alfaro-Moreno, E. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: A review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 279371. [[CrossRef](#)]
37. Bartolo, M.A.; Qureshi, M.U.; Colebank, M.J.; Chesler, N.C.; Olufsen, M.S. Numerical predictions of shear stress and cyclic stretch in pulmonary hypertension due to left heart failure. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2022**, *21*, 363–381. [[CrossRef](#)]
38. Welsh, D.J.; Peacock, A.J. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *High Alt. Med. Biol.* **2013**, *14*, 111–116. [[CrossRef](#)]
39. Humbert, M.; Morrell, N.W.; Archer, S.L.; Stenmark, K.R.; MacLean, M.R.; Lang, I.M.; Christman, B.W.; Weir, E.K.; Eickelberg, O.; Voelkel, N.F.; et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *43*, 13s–24s. [[CrossRef](#)]
40. Tamagawa, E.; Bai, N.; Morimoto, K.; Gray, C.; Mui, T.; Yatera, K.; Zhang, X.; Xing, L.; Li, Y.; Laher, I.; et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2008**, *295*, L79–L85. [[CrossRef](#)]
41. Capasso, L.; Camatini, M.; Gualtieri, M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **2014**, *226*, 28–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sanchez, A.; Alvarez, J.L.; Demydenko, K.; Jung, C.; Alpizar, Y.A.; Alvarez-Collazo, J.; Cokic, S.M.; Valverde, M.A.; Hoet, P.H.; Talavera, K. Silica nanoparticles inhibit the cation channel TRPV4 in airway epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2017**, *14*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Di Bucchianico, S.; Gliga, A.R.; Akerlund, E.; Skoglund, S.; Wallinder, I.O.; Fadeel, B.; Karlsson, H.L. Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2018**, *15*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ivask, A.; Titma, T.; Visnapuu, M.; Vija, H.; Kakinen, A.; Sihtmae, M.; Pokhrel, S.; Madler, L.; Heinlaan, M.; Kisand, V.; et al. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 1914–1929. [[CrossRef](#)]
45. Lu, S.; Duffin, R.; Poland, C.; Daly, P.; Murphy, F.; Drost, E.; Macnee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. Efficacy of simple short-term in vitro assays for predicting the potential of metal oxide nanoparticles to cause pulmonary inflammation. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 241–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Abdal Dayem, A.; Hossain, M.K.; Lee, S.B.; Kim, K.; Saha, S.K.; Yang, G.M.; Choi, H.Y.; Cho, S.G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 120. [[CrossRef](#)]
47. Zemskov, E.A.; Lu, Q.; Ornatowski, W.; Klinger, C.N.; Desai, A.A.; Maltepe, E.; Yuan, J.X.; Wang, T.; Fineman, J.R.; Black, S.M. Biomechanical Forces and Oxidative Stress: Implications for Pulmonary Vascular Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *31*, 819–842. [[CrossRef](#)]
48. Delfino, R.J.; Sioutas, C.; Malik, S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 934–946. [[CrossRef](#)]
49. Pacher, P.; Szabo, C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 136–141. [[CrossRef](#)]
50. Zhao, Y.; Vanhoutte, P.M.; Leung, S.W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* **2015**, *129*, 83–94. [[CrossRef](#)]
51. Billaud, M.; Marthan, R.; Savineau, J.P.; Guibert, C. Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Spescha, R.D.; Glanzmann, M.; Simic, B.; Witassek, F.; Keller, S.; Akhmedov, A.; Tanner, F.C.; Luscher, T.F.; Camici, G.G. Adaptor protein p66(Shc) mediates hypertension-associated, cyclic stretch-dependent, endothelial damage. *Hypertension* **2014**, *64*, 347–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hu, Y.; Chi, L.; Kuebler, W.M.; Goldenberg, N.M. Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells* **2020**, *9*, 2338. [[CrossRef](#)]

54. Zhang, H.; Ji, Z.; Xia, T.; Meng, H.; Low-Kam, C.; Liu, R.; Pokhrel, S.; Lin, S.; Wang, X.; Liao, Y.P.; et al. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4349–4368. [[CrossRef](#)]
55. Tamura, Y.; Phan, C.; Tu, L.; Le Hires, M.; Thuillet, R.; Jutant, E.M.; Fadel, E.; Savale, L.; Huertas, A.; Humbert, M.; et al. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 1956–1970. [[CrossRef](#)]
56. Korff, T.; Aufgebauer, K.; Hecker, M. Cyclic stretch controls the expression of CD40 in endothelial cells by changing their transforming growth factor-beta1 response. *Circulation* **2007**, *116*, 2288–2297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ducret, T.; Guibert, C.; Marthan, R.; Savineau, J.P. Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* **2008**, *43*, 315–323. [[CrossRef](#)]
58. Li, L.; Bi, Z.; Hu, Y.; Sun, L.; Song, Y.; Chen, S.; Mo, F.; Yang, J.; Wei, Y.; Wei, X. Silver nanoparticles and silver ions cause inflammatory response through induction of cell necrosis and the release of mitochondria in vivo and in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* **2021**, *37*, 177–191. [[CrossRef](#)]
59. Bartolak-Suki, E.; Imsirovic, J.; Nishibori, Y.; Krishnan, R.; Suki, B. Regulation of Mitochondrial Structure and Dynamics by the Cytoskeleton and Mechanical Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1812. [[CrossRef](#)]
60. Freund-Michel, V.; Khoyarattee, N.; Savineau, J.P.; Muller, B.; Guibert, C. Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *55*, 93–97. [[CrossRef](#)]
61. Genchi, G.; Sinicropi, M.S.; Lauria, G.; Carocci, A.; Catalano, A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Prakash, Y.S.; Pabelick, C.M.; Sieck, G.C. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest* **2017**, *152*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Chambers, E.; Rounds, S.; Lu, Q. Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis in Emphysema and Acute Lung Injury. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **2018**, *228*, 63–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chistiakov, D.A.; Shkurat, T.P.; Melnichenko, A.A.; Grechko, A.V.; Orekhov, A.N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: A brief review. *Ann. Med.* **2018**, *50*, 121–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, X.; Yao, J.M.; Fang, X.; Zhang, C.; Yang, Y.S.; Hu, C.P.; Chen, Q.; Zhong, G.W. Hypoxia promotes pulmonary vascular remodeling via HIF-1alpha to regulate mitochondrial dynamics. *J. Geriatr. Cardiol.* **2019**, *16*, 855–871. [[CrossRef](#)]
66. Marquez-Jurado, S.; Diaz-Colunga, J.; das Neves, R.P.; Martinez-Lorente, A.; Almazan, F.; Guantes, R.; Iborra, F.J. Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 389. [[CrossRef](#)]
67. Kapustnik, V. Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease with Concomitant Hypertension. *Georgian Medical News*, 1 July 2016; 29–33.

Résumé et conclusion :

À travers cette étude nous avons, dans un premier temps, montré que dans les conditions pathologiques, les NPs de NiO induisent, dans les cellules HPAEC, un stress oxydant significativement plus important (augmentation plus importante des ERO globales et d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial) que celui observé en conditions physiologiques.

Nos résultats suggèrent, également, que la potentialisation des effets oxydatifs induite par les NPs de NiO, dans les cellules HPAEC en conditions pathologiques, est à l'origine (i) d'une exacerbation de la réponse pro-inflammatoire (caractérisée par une augmentation plus importante de la sécrétion d'IL-6), (ii) d'une aggravation de l'altération de l'homéostasie calcique (caractérisée par une augmentation plus importante de la $[Ca^{2+}]_i$) et (iii) d'une diminution de la biodisponibilité du NO via la formation de métabolites du NO tels que les nitrites qui pourrait en partie expliquer la dysfonction endothéliale retrouvée dans l'HTP.

Nous nous sommes, ensuite, intéressés à l'effet des NPs de NiO sur la fonction mitochondriale. Il est intéressant de souligner que, en l'absence de NPs, les cellules cultivées en conditions pathologiques ont 50 % de leur fonction mitochondriale altérée par rapport aux HPAEC placées en conditions physiologiques. Ce phénomène est significativement amplifié lorsque les cellules sont cultivées en conditions pathologiques et exposées aux NPs de NiO. Il est également important de noter qu'une altération de la dynamique mitochondriale est un marqueur précoce de l'HTP.

En conclusion, cette étude montre qu'en conditions pathologiques, dans les HPAEC, les NPs de NiO induisent une exacerbation du stress oxydant, de la production de nitrites, de la réponse pro-inflammatoire, de l'altération de l'homéostasie calcique ainsi qu'une augmentation de la dysfonction mitochondriale.

Ces résultats suggèrent donc que l'exposition, par inhalation, aux NPs de NiO pourrait aggraver certains événements physiopathologiques chez les travailleurs miniers et la population environnante souffrant de maladies cardiovasculaires préexistantes telle que l'HTP et que ces patients seraient plus sensibles à ces polluants particuliers.

2. *Anguilla marmorata* : cible de la contamination des rivières aux métaux : Première étude sur la bioaccumulation des métaux et la transcription des gènes chez *Anguilla marmorata* vivant dans des rivières sous influence minière en Nouvelle-Calédonie

Introduction :

La pollution des eaux douces par les métaux est aujourd'hui un réel problème généralisé de pollution environnementale à l'échelle mondiale, impactant plusieurs espèces de poissons, surtout les poissons carnivores de fin de chaîne trophique (Couture et al., 2008, Javed and Usmani, 2013, Pierron et al., 2009). En Nouvelle-Calédonie, les activités minières d'extraction de nickel sont une source potentielle de pollution des rivières par les métaux. En effet les sols latéritiques riches en Cr, Co, Mn et Ni sont soumis à une lixiviation importante des métaux notamment à cause de leur sensibilité à l'érosion naturelle et anthropique, leur faible capacité à retenir l'eau et le climat tropical caractérisé par de fortes pluies entraînant une mobilisation importante de particules riches en métaux des sols vers les eaux douces (Singh et al., 2005, Ashraf et al., 2011a, Ashraf et al., 2011b, Nouri et al., 2008b, Nouri et al., 2008a, Ambatsian et al., 1997, Boula et al., 2022, Pasquet et al., 2018, Gunkel-Grillon et al., 2014). De premières études ont démontré que les écosystèmes terrestres et aquatiques en Nouvelle-Calédonie sont fortement impactés et altérés par ces activités minières (Bonnet et al., 2014, Hedouin et al., 2007), mais aucune étude n'a été menée sur l'impact toxique de ces métaux et particules associées à l'activité minière sur les anguilles marbrées, *Anguilla marmorata*. Néanmoins, des études préliminaires ont mis en évidence une forte bioaccumulation de Ni, Cr, Co et Mn dans les branchies et les foies des anguilles vivant sous influence minière (Bonnet et al., 2014, Hedouin et al., 2007, CNRT-Nickel).

Comme évoqué précédemment, les anguilles sont des poissons particulièrement sensibles à la contamination des eaux par les métaux. En effet, à long terme, une exposition à des concentrations en métaux trop importantes pourrait conduire au déclin de leurs populations, par des altérations morphologiques et métaboliques dues à l'accumulation des métaux dans les organes, notamment, au niveau du foie, des reins et des branchies (Pierron et al., 2007, Buttermore et al., 2018, Gauthier et al., 2009).

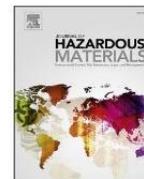
Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de déterminer les conséquences de la contamination par les métaux chez l'anguille marbrée *A. marmorata* vivant sous influence minière en Nouvelle-Calédonie, en étudiant : (i) des paramètres morphométriques ; (ii) les concentrations de métaux dans le foie, les branchies, les reins, les muscles et le cœur ; et (iii)

le niveau de transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, le stress oxydant, la détoxification, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'immunité dans six organes ou tissus différents : le foie, les branchies, les reins, les muscles, le cerveau et la rate.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Impact of nickel mining in New Caledonia on marbled eels *Anguilla marmorata*

Ophélie Germande^{a,b,c}, Peggy Gunkel-Grillon^d, Yannick Dominique^e, Agnès Feurtet-Mazel^{a,c},
Emilie Bierque^d, Emilie Dassié^{a,c}, Guillemine Daffe^f, Fabien Pierron^{a,c},
Isabelle Baudrimont^{a,b,1}, Magalie Baudrimont^{a,c,*,1}

^a Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

^b Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique, avenue du Haut Léveque, Pessac F-33604, France

^c Université de Bordeaux, CNRS, EPHE, UMR EPOC 5805, Place du Dr Peyneau, Arcachon F-33120, France

^d Institut des Sciences Exactes et Appliquées, ISEA, Université de la Nouvelle-Calédonie BPR4, 98851 Cedex Noumea, New Caledonia

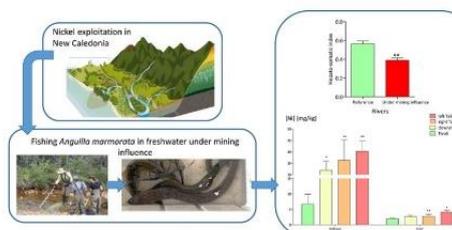
^e Bioeko, 7 bis rue Suffren, 98800 Nouméa, New Caledonia

^f Univ. Bordeaux, CNRS, Observatoire Aquitain des Sciences de l'Univers, UAR 2567 POREA, Pessac F-33615, France

HIGHLIGHTS

- Nickel open pit mining in New Caledonia has a negative impact on *Anguilla marmorata*.
- Kidneys appear to be the most bioaccumulated organ for nickel, chrome and cobalt.
- Liver seems to be the main affected organ (transcriptomic results and HSI).
- A correlation is found between metal contamination and hepatic impacts.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Jörg Rinklebe

Keywords:

New Caledonia
Metals
Eels
Bioaccumulation
Gene transcription

ABSTRACT

New Caledonia is particularly affected by nickel open pit mining activities because of the presence of ultramafic soils rich in metals. The particles dispersed by atmospheric transport and soil erosion during the excavation of nickel end up by deposition or leaching in rivers where they may be bioaccumulated by organisms living downstream the mines. Despite alarming freshwater metals concentrations, no study investigated the level of their bioaccumulation in eels, and if high bioaccumulation levels occur, the potential consequences on their health. The aim of this study was to determine how eels *Anguilla marmorata* are impacted in situ by metals issued from mining activity by measuring: morphometric parameters; metal concentrations in tissues and organs and transcription levels of target genes encoding proteins involved in several metabolic key functions. Among organs, liver was found to be the most affected by mining with average nickel concentrations of 5.14 mg/kg versus 1.63 mg/kg for eels away from mines leading to dysregulation of numerous genes involved in oxidative stress, DNA repair, apoptosis, reproduction and both lipid and mitochondrial metabolisms. This study should allow us to define in an integrated way if metals released by mining activities influence metals bioaccumulation in eels and induce biological effects.

* Corresponding author at: Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France.

E-mail address: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr (M. Baudrimont).

¹ co-last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129285>

Received 30 March 2022; Received in revised form 23 May 2022; Accepted 31 May 2022

Available online 3 June 2022

0304-3894/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aquatic ecosystems are particularly impacted by anthropogenic pollutants since many years, especially by metals coming from industrial, urban or agricultural sources, such as cadmium (Cd), mercury (Hg), zinc (Zn) or nickel (Ni) for instance, causing harmful impacts on species living in these environments. Some studies have already highlighted the toxic effects of water metal pollution on fish such as the yellow perch *Perca flavescens*, the spiny eel *Mastecembelus armatus*, or the European eel *Anguilla anguilla* (Couture et al., 2008; Javed and Usmani, 2013; Pierron et al., 2009).

Among the human activities responsible of this pollution, today, mining activities represent the second source of heavy metal soils contamination in the world (Younger, 2001). In fact, soils are subjected to significant metal leaching due to the high concentration of heavy metals and the low capacity of the soil to retain water. Metals can then persist a long time in aquatic environment (Singh et al., 2005; Ashraf et al., 2011a, 2011b; Nouri et al., 2008a, 2008b). This type of contamination is particularly important in New Caledonia, one of the largest Ni producer in the world with resources concentrated in ultramafic formations covering 30% of the subsoils (Isnard et al., 2016). These formations are particularly rich in metal trace elements including Ni, chromium (Cr), cobalt (Co), and manganese (Mn) (Losfeld et al., 2015). Natural erosion, due to the laterite soils fragility and instability, especially under tropical climate conditions characterized by heavy rains (Ambatsian et al., 1997), leads to mobilization of particles rich in metals from soils to freshwater (He et al., 2005; Pasquet et al., 2018; Boula et al., 2022; Gunkel-Grillon et al., 2014). Anthropogenic activities that destroy vegetation and reshape the soils like mining, increase this process by increasing soil leaching and exposing metals rich deep horizons. Runoff water is the main pathway of particles dispersion from soils to freshwater. Atmospheric dust issued from this soils can also contribute to a lesser extend to freshwater contamination. The dust concentration of Ni and Cr in Noumea are particularly elevated in comparison with other countries (Fry et al., 2021). These particles finally end up by deposition or leaching in aquatic environment, and may affect living organisms in freshwaters downstream the mines.

In rivers under mining influence, high Ni concentrations are reported, around 96 µg/L, compared to those away from mining on the same type of lateritic soil, around 7 µg/L (Boula et al., 2022), confirming the high-water pollution level in this country. Indeed, these values are largely above the European regulation recommendations (< 4 µg/L). The increased use of Ni in industry may contribute to increase anthropic and natural emission of particles and, consequently, increase the risk of fish contamination. Some authors have demonstrated natural ecosystem and lagoon degradations due to Ni exploitations in New Caledonia (Gunkel-Grillon et al., 2014; Kettle et al., 2007; Hedouin et al., 2007) and recent studies have revealed that the contamination of aquatic organisms is directly linked to the enrichment of soils by Ni (Bonnet et al., 2014). A significant bioaccumulation of Ni in gills and livers of five species (carp *Khulia rupestris*, white and black lochon *Awaous guamensis* and *Sicyopterus lagocephalus*, tilapia *Sarotherodon occidentalis* and marbled eel *Anguilla marmorata*) living in rivers under mining influence in the north of New Caledonia have been highlighted too (DMML project). Among these species, marbled eels, *Anguilla marmorata*, are particularly interesting and not yet studied with regards to metals contamination in New Caledonia. Eels, as top predator, are good bio-indicators of water metal contamination (van der Oost and V.P. N., 2002; Barak and Mason, 1990; Durrieu et al., 2005) as they accumulate metals previously consumed by other species. Furthermore, with a complex biological life cycle, characterized by different stages of metamorphoses as previously described by (Van Ginneken and Maes, 2005), eels are particularly sensitive to water pollution. Indeed, during their juvenile growth stage, eels, living in freshwaters during several years, must accumulate energy reserves before starting their migration to reproduce themselves in open sea, tens of thousands kilometers away.

During this migration, eels swim for several months, stop to feed and mature their gonads. Therefore, the quality of life in freshwaters is essential to ensure the success of migration and reproduction (Boetius and Boetius, 1980; Pierron et al., 2008) and prevent the marbled eel decline.

It is well known that other eel's species, like European eels, see their populations decrease due to metal contamination for instance by mercury (Castro et al., 2018). This decline could be explained by morphometric alteration and metabolic parameters dysfunction especially due to oxidative stress, mitochondria disruption and carcinogenic factors activation (Pierron et al., 2007; Buttermore et al., 2018; Gauthier et al., 2009).

Regarding the metals accumulated in eel's organs, previous studies suggested that metal concentration in organs can be used as a first proxy to assess metal toxicity, and the physiological consequences in each organ. Liver, kidneys and gills seems to be the main metals accumulating organs in European eels. It seems essential to know these parameters on marbled eels to clarify the consequences of water contamination in New Caledonia. Furthermore, determining if Ni and other associated metals accumulate in marbled eels muscles is essential to estimate the risk for human's consumption (Qian et al., 2020). In New Caledonia, marbled eels living downstream mining sites seem to accumulate important Ni and other associated metals in their organs, but the consequences of this accumulation are unknown yet. The aim of this study was thus to determine the consequences of Ni and associated metals contamination in *Anguilla marmorata* by studying: (i) morphometric parameters; (ii) metal concentrations in liver, gills, kidneys, muscle and hearts; and (iii) transcription level of genes encoding proteins involved in lipid metabolism, oxidative stress, detoxification, cell cycle regulation, DNA repair and immunity in six different organs or tissues: liver, gills, kidneys, muscle, brain and spleen.

2. Materials and methods

2.1. Animals and biometric measurements

Twenty-one immature yellow marbled eels, *Anguilla marmorata*, were captured by electric fishing in May 2016 and July 2021 near the Koniambo Mount of New Caledonia in four different sites (with 4–6 individuals per site). Three sites were used for their high metal concentration levels due to the soil composition (ultramafic soils) and the proximity of an open pit mine (Koniambo Nickel SAS, KNS) operating since 1997 along the Taléa river: left Taléa (LT) directly located downstream the mine; right Taléa (RT) not influenced by the mine; and downstream Taléa (DT), after the confluence between the two arms of the Taléa river (Fig. 1). One site was used as a reference located on a volcano-sedimentary soil, the downstream of the Tivoli river (Tiv). These sites are located on an intertropical climate zone, with an average of 1071.5 mm of water each year (MétéoNC), leading to important soil erosion and leaching in freshwaters.

Anguilla marmorata total body lengths and weights were first recorded to determine the Fulton condition factor [weight of eel (g) / (total length of the fish)³ (cm³)]. Eels were then euthanized and kidneys, brain, muscle, liver, gills, heart and spleen were recovered for further analyses. The total weight of liver was measured to calculate the hepatosomatic index (weight of the liver / total weight of the fish x 100). Samples for RT-qPCR analyses were immediately fixed in RNA lysis buffer before to be stored at – 20 °C until analyses. Samples for metal analyses were stored as soon as possible at – 20 °C until analyses.

2.2. Metal concentration determination

Biological samples: kidneys, muscles, gills, liver and heart, were oven dried (72 h at 50 °C), grounded into a finely homogenized powder using an agate mortar, weighed and then digested with 1.5 mL of nitric acid 20% at 200 °C for 15 min (Microwave Acid Digestion - MARS 6,

CEM, "Fish tissue" method). After the mineralization, 1.5 mL of ultra-pure water (Milli-Q, Bedford, MA, USA) was added to each sample. Six metals were analyzed simultaneously by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (700 Series ICP-OES, Agilent): Ni, Co, Cu, Cr and Mn. Certified reference materials DOLT-5 (dogfish (*Squalus acanthias* liver)), TORT-3 (Lobster Hepatopancreas), and IAEA-413 (Algae) were analyzed using the same methodology as the eel samples. Their recovery rates, limit of detection and quantification are presented in Table 1. Metal concentrations are expressed in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. For values below the instrument detection limit, theoretical minimum concentration values were calculated (the detection limit of the instrument (in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) multiplied by the volume of the sample (in L) divided by the sample weight (in g)).

2.3. Gene transcription

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was used to determine mRNA transcription levels in fish sampled in 2021. In order to obtain the coding sequences of target genes, cDNA sequences from the assembled transcriptome of *A. anguilla* (Perrier et al., 2020; Coppe et al., 2010) were aligned with the assembled genome of *A. marmorata* (GCA_901111315.1) using the Blast program. Sequences with high homologies were then used to design specific primers for *A. marmorata* by means of the primer3plus software (Table 1; (Untergasser et al., 2007)). Total mRNA extraction was performed from liver, kidneys, gills, brain, spleen and muscles samples using a commercially available NucleoZOL (RNA isolation, nucleoZOL, Marcherey-nagel®, USA), according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was done by M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase kit (Promega). Finally, PCR reactions were performed using a LC480 (Roche), 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each 15 μl reaction contained 7.5 μl GoTaq qPCR Master mix (Promega), 5 μl template and the specific primer pairs at a final concentration of 200 nM each. The reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product. The ribosomal protein L7 (*rpl7*) and β -actin (*β -act*) genes were used as

Table 1,

Limit of detection and quantification with the recovery rates obtained from the analyses of certified reference materials (TORT-3, DOLT-5 and IAEA-413).

	Ni	Cr	Co	Mn
Limit of Detection ($\mu\text{g}/\text{L}$ \pm SD)	1.91 \pm 0.70	0.46 \pm 0.09	0.97 \pm 0.31	0.045 \pm 0.018
Limit of Quantification at 10% ($\mu\text{g}/\text{L}$ \pm SD)	9.55 \pm 3.30	2.32 \pm 0.46	4.89 \pm 1.53	0.23 \pm 0.09
DOLT-5 recovery rate (% SD)				81.5 \pm 3.10
TORT-3 recovery rate (% SD)	73.1 \pm 3.30			78.5 \pm 3.80
IAEA-413 recovery rate (% SD)	91.1 \pm 1.30	87.9 \pm 0.90	100.3 \pm 5.10	87.4 \pm 0.80

reference genes. Relative quantification of each gene expression was normalized according to the reference genes and generated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method described by (Livak and Schmittgen, 2001). Amplification efficiencies for all primer sets were calculated; all values proved to be sufficient to allow direct comparison of amplification plots according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM) for n independent samples with five and four sampled eels in Left Taléa in 2016 and 2021 respectively, three in 2016 and five in 2021 in Right Taléa, five in 2016 and six in 2021 in Downstream Taléa and five in Tivoli in 2016 and 2021. Statistical analyses were performed using analysis of variance: one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons, and t-test to compare each sites to reference site, Tivoli (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$) with GraphPad statistics software (McHugh, 2011). When assumptions necessary for using a parametric test were not met (normality, independence and homoscedasticity of the error term), we used non-parametric test. P values < 0.05 were considered statistically significant. Correlations

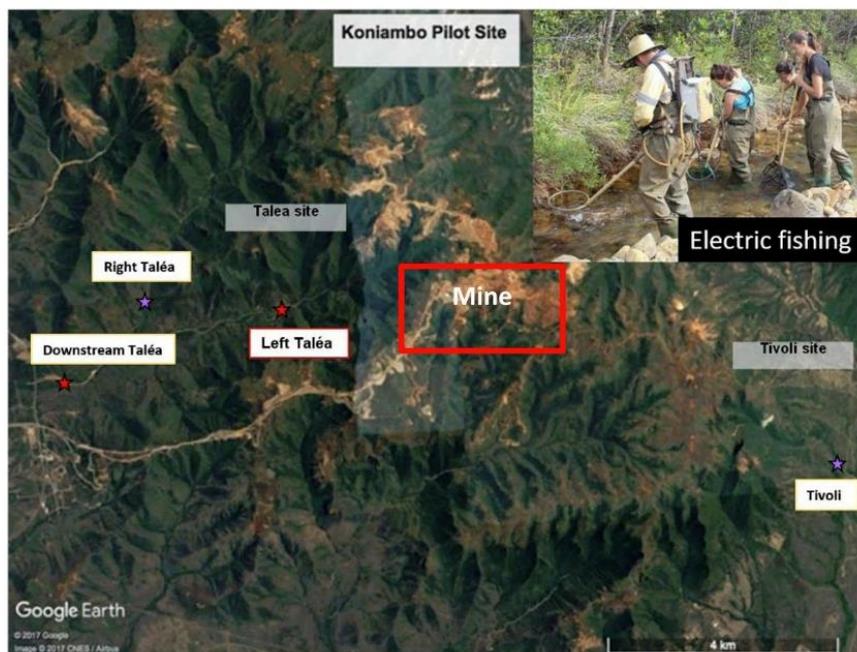


Fig. 1. Map of fishing sites, Koniambo Pilot Site, New-Caledonia. Left Taléa: 164°46'17.7938" E, 20°59'20.1088" S; Right Taléa: 164°44'58.0870" E, 20°59'7.6787" S; Downstream Taléa: 164°44'3.1816" E, 20°59'54.6432" S; Tivoli: 164°52'8.5285" E, 21°0'44.4107" S.

between measured parameters on livers were revealed by principal component analysis using Statistica 13.3 software.

3. Results

3.1. Morphometric parameters

The analyses of *A. marmorata* morphometric parameters showed that eels living in the rivers downstream the mines are significantly smaller (** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ respectively for RT and LT rivers) than eels from the reference site (Tivoli), and this for the two periods (Fig. 2A). Furthermore, eels taken from the same rivers had approximately the same size in 2016 and 2021, for example in LT they measured 31.02 ± 4.58 cm in 2016 and 27.75 ± 3.1 cm in 2021. The Fulton condition index did not vary among sites in July 2021, but in May 2016, eels living in Taléa rivers had a lower Fulton index as compared to those from Tivoli (** $P < 0.01$). However, the hepato-somatic index varied in the same way for the two periods, with a significant lower value for eels living in Taléa rivers in 2016 (** $P < 0.01$) and 2021 (* $P < 0.05$) compared to those collected in Tivoli (Fig. 3).

3.2. Metals bioaccumulation in fish organs

Metals concentrations were determined for Ni, Cr, Co and Mn in liver, gills and muscle at both periods, 2016 and 2021. Kidneys and hearts were only analyzed in 2021.

For Ni, the results showed hepatic concentrations significantly higher for eels living in Taléa river, particularly in LT, than those living in Tivoli, either in 2016 or 2021 (Fig. 4). For muscle in 2016 and 2021, and for kidneys and hearts in 2021, the same patterns were observed, with highest concentrations measured in eels from LT. The same tendencies were thus observed on both periods except for gills, for which Ni concentrations were largely higher in 2016 than in 2021 (28.34 mg/kg and only 2.58 mg/kg in LT respectively for 2016 and 2021).

Eels collected from Taléa rivers accumulated also more Cr in their liver than eels living in Tivoli ($p = 0.003$ in 2016 and $p = 0.024$ in 2021) for the two periods of sampling (Fig. 5). Gills and muscle in 2016 bioaccumulated Cr to a greater extent in LT and kidneys in 2021 in all Taléa sites compared to Tiv.

For Co, results showed concentrations significantly higher for eels living in Taléa rivers than those living in Tivoli for liver in 2016 and 2021 and for kidneys and heart in 2021 (Fig. 6). In 2016, the Co concentrations in muscle were higher in Taléa compared to Tivoli ($p = 0.0034$). For gills, only the concentrations measured in DT were significantly higher than the other sites in 2016, but in 2021, also those from RT bioaccumulated more Co than eels from Tiv.

For Mn in 2016, no significant difference in concentrations was observed among sites, but in 2021 for heart and gills, Mn concentrations were higher in LT or RT respectively as compared to Tiv ($p = 0.02$ and $p = 0.05$ respectively) (Fig. 7).

We can observe that the metal that is the most concentrated in the organs is Mn, then Ni. For Cr and Co the concentrations are of the same order of magnitude in the organs, whereas the concentration of Cr in the freshwaters is always higher than that of Co.

3.3. Gene transcription levels

To assess the impact of Ni and other associated metals from mining activity in organs of eels, RT-qPCR analyses were carried out on six organs: liver, kidneys, gills, brain, spleen and muscle from eels sampled in 2021. Fifteen genes were analyzed to explore the internalization (*cltb*); the oxidative stress (*sod_{zn/cu}* *sod_{mn}*); the metal detoxification (*mt*); the mitochondrial metabolism (*12s*; *cox1* and *atp6-8*); the lipid metabolism (*acc*; *tgl* and *gapdh*); the reproductive function (*vtg*); the apoptosis (*p53* and *bax*); the DNA repair (*gadd45*) and the immune system (*nlr3*). The results showed that liver was the most impacted organ, as the transcription level of almost 12 genes on the 16 studied was differentially regulated in eels from one or several Taléa sites compared to Tivoli

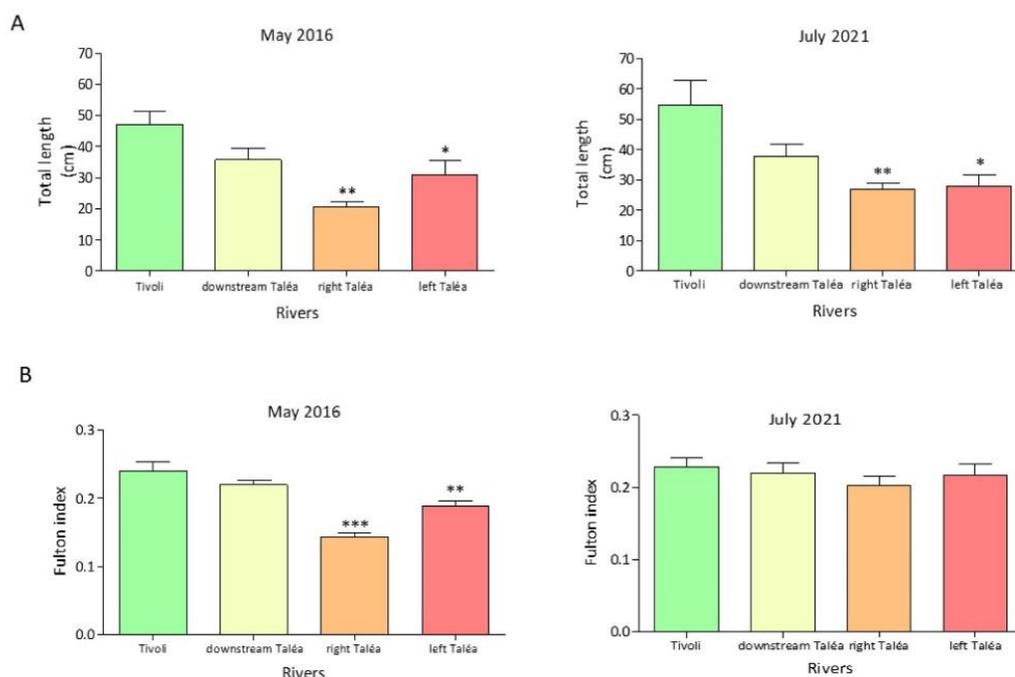


Fig. 2. . A. Total length (cm, mean \pm SEM) of eels in May 2016 ($n = 4-6$) and July 2021 ($n = 5$). B. Fulton condition index (mean \pm SEM) of eels in May 2016 ($n = 4-6$) and July 2021 ($n = 5$). Means designated with star (*) are significantly different as compared to the reference Tivoli site (one-way analysis ANOVA followed by Tukey's post-test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

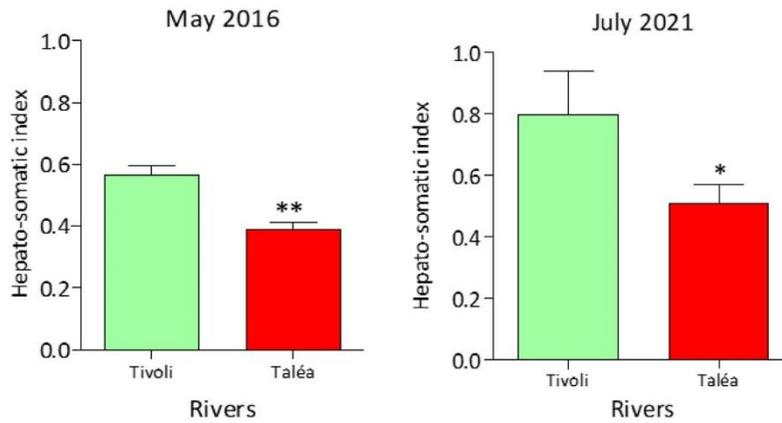


Fig. 3. Hepato-somatic index (mean ± SEM) of eels sampled in May 2016 (n = 5–13) and July 2021 (n = 5–9). Means designated with star (*) or (**) are significantly different as compared to the reference Tivoli site (t-test, * P < 0.05; ** P < 0.01).

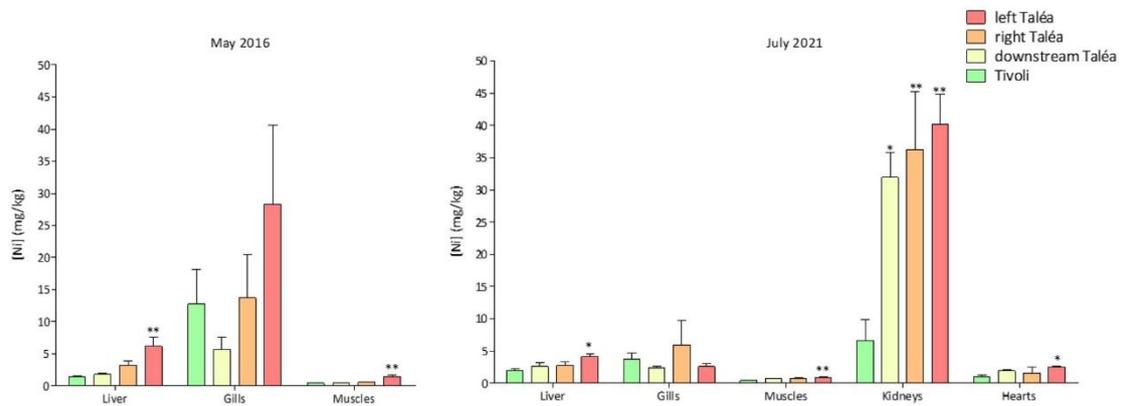


Fig. 4. Ni concentrations (mg/kg) in liver, gills, muscles, kidneys and hearts of eels sampled in Koniambo Mount in New Caledonia (mean ± SEM, n = 3–5 in 2016 and n = 4–6 in 2021). Means designated with star (*) are significantly different as compared to the reference Tivoli site (one-way analysis ANOVA followed by Tukey’s post-test, * P < 0.05; ** P < 0.01).

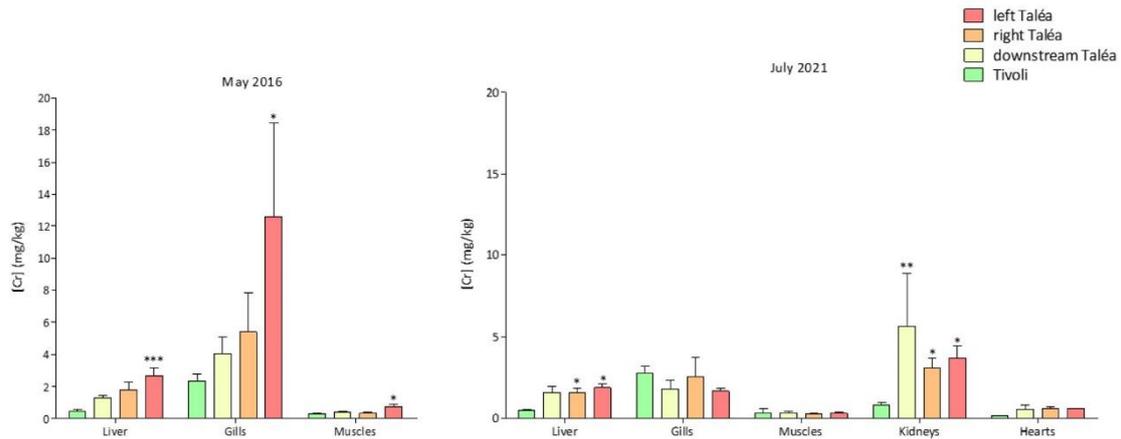


Fig. 5. Cr concentrations (mg/kg) in liver, gills, muscle, kidneys and heart of eels sampled in Koniambo Mount in New Caledonia (mean ± SEM, n = 3–5 in 2016 and n = 4–6 in 2021). Means designated with star (*) are significantly different as compared to the reference Tivoli site (one-way analysis ANOVA followed by Tukey’s post-test, * P < 0.05; ** P < 0.01).

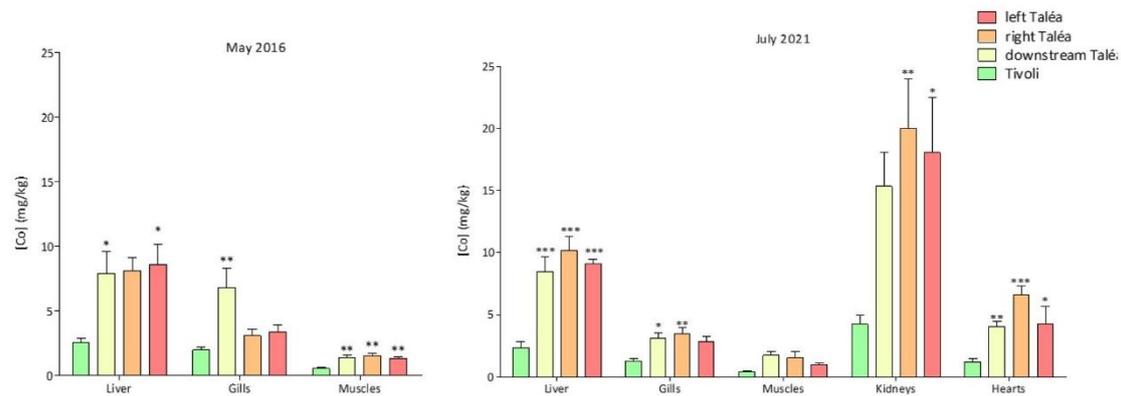


Fig. 6. : Co concentrations (mg/kg) in liver, gills, muscle, kidneys and heart of eels sampled in Koniambo Mount in New Caledonia (mean \pm SEM, n = 3–5 in 2016 and n = 4–6 in 2021). Means designated with star (*) are significantly different as compared to reference site Tivoli (one-way analysis ANOVA followed by Tukey's post-test, * P < 0.05; ** P < 0.01).

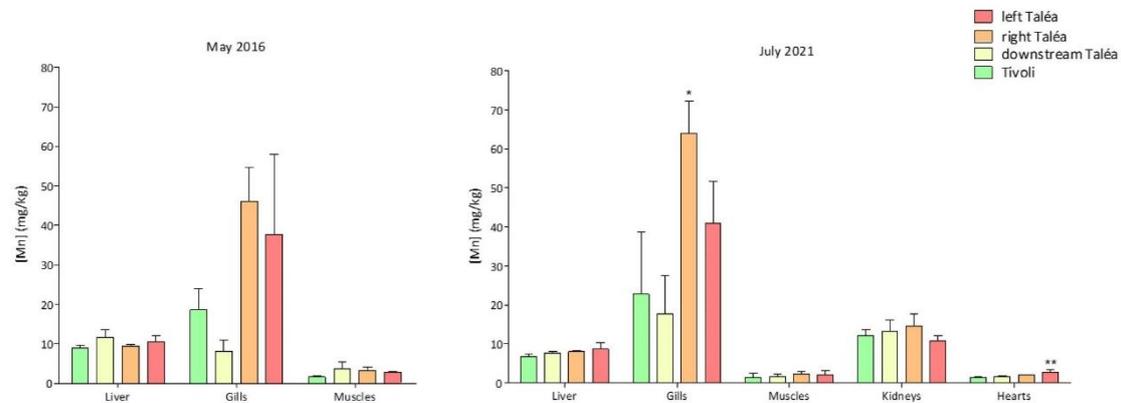


Fig. 7. : Mn concentrations (mg/kg) in liver, gills, muscle, kidneys and heart of eels sampled in Koniambo Mount in New Caledonia (mean \pm SEM, n = 3–5 in 2016 and n = 4–6 in 2021). Means designated with star (*) are significantly different as compared to the reference Tivoli site (one-way analysis ANOVA followed by Tukey's post-test, * P < 0.05; ** P < 0.01).

(up-regulation for oxidative stress and lipid metabolism and down-regulation for mitochondrial metabolism, DNA repair, apoptosis, reproduction and immunity) (Tables 2 and 3).

The kidneys showed only up-regulated genes involved in lipid metabolism, DNA repair, apoptosis, endocytosis and immunity.

The gills were on the one hand up-regulated for genes involved in oxidative stress and metal detoxification and on the other hand down-regulated for genes involved in apoptosis.

Finally, brain and spleen are the less affected organs with only one gene that was differentially regulated (down-regulation of *atp6-8* for spleen and up-regulation of *gadd45* for brain).

No difference in gene transcription level was observed in muscles.

3.4. Multivariate analysis on the liver

As the liver appeared as the most impacted organ in eels living on ultramafic soils impacted by mining activities, a Principal Component Analysis (PCA) was done between the several studied parameters - morphometric parameters, metals bioaccumulation and transcriptomic responses (Fig. 8). The PCA explained a total of 97.48% of the variability of the data, with the axis 1 the more discriminant (89.23%) and corresponding to the most contaminated and disruptive stations on the right (especially Left Taléa) and the less contaminated one on the left (Tivoli). Significant correlations are observed between Ni, Mn, Cr and to a lesser

extent Co with genes implicated in oxidative stress and lipid metabolism on the most contaminated site (LT). On the contrary, morphological parameters are correlated to genes implied in reproduction, in mitochondrial metabolism, in immunity, in cell cycle regulation and correspond to the reference site Tiv.

4. Discussion

This study aimed to assess the consequences for *Anguilla marmorata* to live in freshwaters downstream Ni mines in New Caledonia, region particularly affected by mining activities due to the composition of soils particularly rich in Ni. Eels are known to be sensitive to water metal contamination (Durrieu et al., 2005) that could affect their migration and reproduction leading to a decline of their populations (Buttermore et al., 2018; Gauthier et al., 2009). Until now, no study was conducted in New Caledonia on this species, whereas eels are present in freshwaters as top fish predators and are potentially collected by local populations to be eaten. Thus in this project, we collected eels in four sites (three on ultramafic soils along the Taléa river, with one arm directly under mining influence, and one as a reference site, Tivoli river) to assess the bioaccumulation of metals and their toxicity. The fish were sampled at two different periods, in May 2016 and July 2021, in order to assess the influence of time on parameters of interest and to verify whether the observed effects could be maintained over time.

Table 2
Specific primer pairs used for RT-qPCR.

Gene name	Gene code	Function	Forward primer	Reverse primer	Efficiency (mean ± SEM)
<i>ribosomal protein l7</i>	<i>rpl7</i>	Ribosomal components (reference gene)	5'-GCATCTGGGCAATTACCATT-3'	5'-CAAGGAACTGGCTACCAAGC-3'	98.2 ± 8%
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i>	Cell structure (reference gene)	5'-CTCTATCGTCCACCGCAAAT-3'	5'-CACCTTCACCGTTTCCAGT-3'	93.4 ± 5%
<i>clathrin b</i>	<i>cltb</i>	Internalization	5'-GCAGAAGTCCCATAGGTCCA-3'	5'-AACACCGGAAGCGTAATGTC-3'	91.2 ± 8%
<i>superoxide dismutase zinc/copper</i>	<i>sodzn/cu</i>	Oxidative stress (copper/zinc)	5'-TCAAGGACAGAATGCTCAG-3'	5'-TGCCTTTGGGACACCCCTTAC-3'	90.8 ± 5%
<i>superoxide dismutase manganese</i>	<i>sodmn</i>	Oxidative stress (manganese)	5'-CGCCACATATGTCAACAACC-3'	5'-TAGGGGACAGGTTTGTCCAG-3'	106.2 ± 8%
<i>metallothioneine</i>	<i>mt</i>	Metal homeostasis detoxification	5'-CGAGTGCTGTCCAGTGAAGA-3'	5'-GCTCTGCATGGATGACAAAA-3'	88.7 ± 4%
<i>ribosomal rna 12 s</i>	<i>12 S</i>	Mitochondrial metabolism	5'-CTCACCATCCCTTGCCATAA-3'	5'-CTCAGAGCCGGTTTCAAAG-3'	91.7 ± 1%
<i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i>	<i>cox1</i>	Mitochondrial metabolism	5'-CCAGATGCATACACCCTGTG-3'	5'-CGAATGTGTGGTATGGTGA-3'	91.3 ± 3%
<i>atp synthase membrane subunit 6-8</i>	<i>atp6-8</i>	Mitochondrial metabolism	5'-TGCAGTCCCAATATGACTCG-3'	5'-ATGGCCTGCTGTAGGTTTG-3'	90 ± 4%
<i>acetyl-coa carboxylase</i>	<i>acc</i>	Lipid metabolism	5'-GAGCAGTACAAGCCCGACAT-3'	5'-AGCATGGTACCAGGATGTT-3'	97.4 ± 8%
<i>triglyceride lipase</i>	<i>tgl</i>	Lipid metabolism	5'-GACGCTGTTGTCCAGATGA-3'	5'-GGAACACGTACGAAGCCTA-3'	95.8 ± 10%
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>gapdh</i>	Lipid metabolism	5'-TCTTTTGGGGGATCAAACCTG-3'	5'-TGGCCTCAAAGGAGTAGAGC-3'	99.3 ± 9%
<i>vitellogenin</i>	<i>vtg</i>	precursor of egg yolk	5'-CAGCTGCTTCTCAGCACAAG-3'	5'-AGCCTGAAGAACTGGCAGAA-3'	91.7 ± 2%
<i>bcl-2-associated x protein</i>	<i>bax</i>	Cell cycle arrest/apoptosis	5'-GCGACCCTAACCCACAAGAAG-3'	5'-GTCAAGCTCGTCTCCGATTT-3'	91.2 ± 11%
<i>tumor protein 53</i>	<i>p53</i>	Cell cycle arrest/apoptosis	5'-GAGCCCAAGAAAGGGAAAAG-3'	5'-GACATGGAAGTACCCCAAC-3'	98.9 ± 9%
<i>growth arrest and dna damage-inducible 45</i>	<i>gadd45</i>	DNA repair	5'-CGGTGTTGTCCACTGTGTC-3'	5'-GATGAGGAAGCAGGAGCGA-3'	98.4 ± 12%
<i>nlr family card domain containing 3</i>	<i>nlr3</i>	Immune system	5'-CCTCCAGAGTCCGTGTAGC-3'	5'-TGCGCTTCTGTCTGGTATG-3'	98.7 ± 13%

Table 3
Fold changes in gene transcription levels in eels collected from Taléa river sites (n = 4–6 per site) as compared to eels from the reference Tivoli site. Only significant changes are reported (one-way analysis ANOVA followed by Tukey's post-test, * P < 0.05; ** P < 0.01 as compared to Tivoli) (e.g. red = down regulation and green = up regulation).

Ultramafic rivers	Organs	Genes and function															
		Oxidative stress			Metal detoxification	Mitochondrial metabolism			Lipid metabolism			DNA repair	Apoptosis	Endocytosis	Reproduction	Immunity	
		<i>sod_{cu}</i>	<i>sod_{mn}</i>	<i>cat</i>	<i>mt</i>	<i>12S</i>	<i>cox</i>	<i>atp6-8</i>	<i>gapdh</i>	<i>tgl</i>	<i>AcCoo</i>	<i>gadd45</i>	<i>p53</i>	<i>bax</i>	<i>cltb</i>	<i>Vtg</i>	<i>nlr3</i>
Taléa downstream	Liver	982.0* ± 243.5	14.27* ± 4.11	/	/	/	/	16.85* ± 3.55	/	/	/	0.33* ± 0.22	/	/	/	0.34* ± 0.2	0.2* ± 0.15
Taléa right		1189* ± 752.5	21.98* ± 8.62	/	/	0.20** ± 0.06	/	0.14** ± 0.053	24.4* ± 6.22	/	0.096* ± 0.03	0.34* ± 0.14	0.10* ± 0.045	0.15* ± 0.044	/	0.093* ± 0.04	0.052* ± 0.03
Taléa left		1636* ± 513.6	20.95* ± 4.1	/	/	0.18* ± 0.045	/	0.22* ± 0.06	36.38* ± 11.4	62.02* ± 42.4	0.046* ± 0.016	0.14* ± 0.03	0.078* ± 0.035	0.13* ± 0.032	/	0.074* ± 0.052	0.03* ± 0.018
Taléa downstream	Kidney	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Taléa right		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Taléa left		/	/	/	/	/	/	/	/	3.03* ± 0.97	3.32* ± 0.9	3.92* ± 1.72	/	2.59* ± 0.68	6.29* ± 0.85	/	2.06* ± 0.46
Taléa downstream	Gills	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.32* ± 0.13	/
Taléa right		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.45* ± 0.12	/
Taléa left		24.15* ± 4.89	9.97* ± 1.46	/	3.35* ± 1.43	/	/	/	/	/	/	/	0.36* ± 0.07	0.29* ± 0.035	/	/	/
Taléa downstream	Brain	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Taléa right		/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.8* ± 1.12	/	/	/	/	/	
Taléa left		/	/	/	/	/	/	/	/	/	5.27* ± 1.3	/	/	/	/	/	
Taléa downstream	Spleen	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Taléa right		/	/	/	/	/	/	0.36* ± 0.12	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Taléa left		/	/	/	/	/	/	0.52* ± 0.09	/	/	/	/	/	/	/	/	/

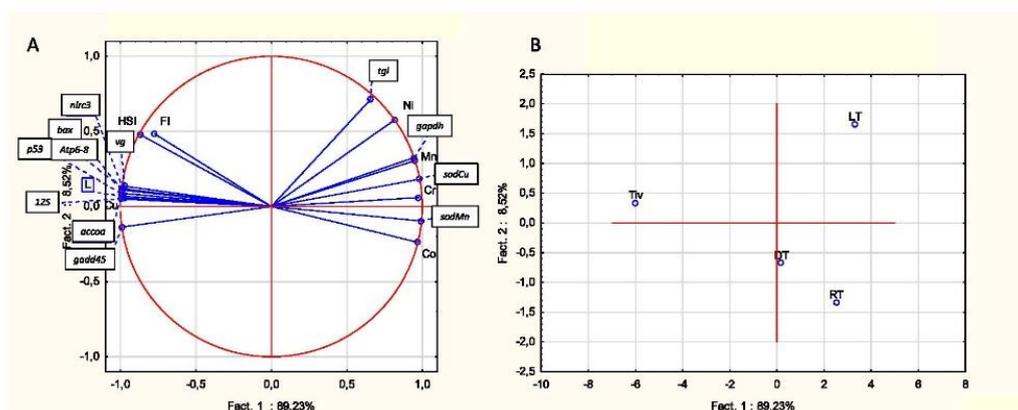


Fig. 8. Principal component analysis of morphometric parameters, metals bioaccumulation and gene transcription levels in liver of *A. marmorata*, after collection in July 2021 on the 4 sites: Tivoli (Tivoli), LT (Left Taléa), RT (Right Taléa) and DT (Downstream Taléa). A. Correlation circle of the different studied parameters. B. Illustration of the sites.

4.1. Morphometric parameters

First of all, we noticed that eels living in rivers downstream the mines were smaller than eels living in the reference site, with a lower hepatosomatic index at both different periods, as it has been already observed in eels exposed to other metals such as Hg and Cd (Barak and Mason, 1990). These results seemed to indicate that eels, in particular their liver function, are probably impacted by physico-chemical or nutrient conditions occurring in Taléa river compared to Tivoli, whatever the period and season. Interestingly, the Fulton index differed between the two periods. Indeed, no differences were observed in 2021, whereas, in 2016, eels living in Taléa presented a smaller Fulton index compared to Tivoli. In 2021, the sampling campaign was done after a long episode of rain, which could explain at least in part the low dissolved metal concentration in the rivers. For example, the concentrations of dissolved Ni was 48 $\mu\text{g/L}$ in 2016 (sampling: 02/02; 09/02; 15/03; 17/03; 18/03 in Left Taléa, (Boula et al., 2022)) compared to 8 $\mu\text{g/L}$ few weeks before the fisheries in 2021 (sampling: 17/05, CNRT QUAVAR project). Indeed, in 2016 the cumulative rainfall in the 6 months preceding the fisheries (December 2015 to May 2016) was 930 mm of rain (an average of 5.2 mm of rain per day) but 2910 mm of rain (an average of 16.2 mm of rain per day) in 2021 (February 2021 to July 2021) (MeteoNC, 2016; MeteoNC, 2021). The higher dissolved metal levels in 2016, could further affect the food chain and eel nutrient quality, but also eels themselves. As the Fulton index reflects the physiological state of the fish (Bolger and Connolly, 1989), it is possible that in 2016, rivers under mining influence offered poor condition for growth and that eels inhabiting these sites were more impacted by metals, and therefore, had a lower condition index.

4.2. Metals bioaccumulation

Due to the composition of laterite soils (Ambatsian et al., 1997; Pasquet et al., 2018), four metals were analyzed in eel organs: Ni, Cr, Co and Mn in 2016 and 2021. This kind of research has never been conducted in New Caledonia on *Anguilla marmorata*. At first, for all metals in 2016 and 2021, a dose-dependent contamination was observed according to the sites under mining influence or not, with eels from Taléa being significantly more contaminated than those from Tivoli. Those results are in line with the metal concentrations in the freshwater, which are much higher in Taléa river compared to Tivoli river.

The same trends were noticed in 2016 and 2021 but some variations especially for metal concentrations in livers and gills were nevertheless observed. In fact, for Ni and Cr, in 2016, eels appeared to be mainly contaminated by the direct route of exposure (i.e. dissolved metals in

water) whereas in 2021 the main route of contamination of eels in Taléa seemed to be the trophic route. This was highlighted by higher metal concentrations in the gills compared to the livers for all sites in 2016 in contrast to 2021 where Ni and Cr concentrations in gills were lower than in livers. Indeed, metals bioaccumulation in the gills is expected to be higher following waterborne exposure, while higher bioaccumulation levels in the liver is followed by absorption of metals from the gut (Wood et al., 2002). It seems that few dissolved metals were assimilated by the gills in 2021, that could also be explained by the moment of the fisheries, which were realized after heavy rain episodes in 2021. As already evoked, these hydrologic conditions in 2021 would have probably diluted the metals in the freshwaters by high leaching of soils during several months before sampling and modified their chemical speciation, with a highest proportion of them adsorbed to particulate matter in 2021 compared to 2016 (Calmano et al., 1993; Walling et al., 2003). All these findings could suggest that the contamination of eels is dependent on the weather conditions and the fishing season. However, the livers are in all cases impacted by higher concentrations of metals measured in eels living under mining influence compared to Tivoli.

In contrast, for Co and Mn the same trends were observed for the two seasons, with contamination mainly via the trophic way for Co and by the direct route for Mn. In 2016, the eels seemed to less accumulate Mn than in 2021. Furthermore, in 2021, two other organs were analyzed: heart and kidneys. Kidneys are the organs that accumulate the highest levels of metals, as they represent the main site of detoxification and excretion (Lawrence and Hemingway, 2003; Elliott et al., 1988). Moreover, numerous studies have shown that for the majority of metals, the highest concentrations in fish are found in the liver and kidneys (Fernandes et al., 2007; Palaniappan and Karthikeyan, 2009; Pannetier et al., 2016). These observations are also reported in our study because for Ni, Co and Cr, kidneys are the organs that bioaccumulated the most. On average, metal concentrations in the kidneys of Taléa eels were 12–16 times higher than those in Tivoli and more important than in gills, confirming the hypothesis of trophic way of contamination. In order to ensure a good migration, eels need an optimal heart capacity, thus, any cardiotoxicity could affect their migration (Imbrogno, 2013; van Ginneken and van den Thillart, 2000). In 2021, we observed that hearts were also affected, to a lesser extent because only eels of the LT site had significantly higher Ni and Mn concentrations than eels living in the reference site, except for Co, for which all eels from Taléa were impacted. Finally, concerning muscle, the accumulations remain very low compared to the other organs, with generally higher values on the most impacted site (LT). These results are in line with the literature which demonstrated that metals, including Ni, accumulates poorly in the fish muscle (Sow et al., 2013). Also in muscle, the concentrations are

under the European recommendation threshold for food, so the consumption for humans of *Anguilla marmorata* in New Caledonia seems totally safe, at least for the metals analyzed in the present study.

4.3. Genes transcription

A clear link has been established between metals bioaccumulation in fish organs and alterations in gene transcription levels, especially those involved in the fight against oxidative stress (Souza et al., 2018). Oxidative stress is known to play a key role in the physiopathology of organs, notably liver, by altering the calcium homeostasis and the mitochondrial function of hepatocytes (Gordeeva et al., 2003; Madreiter-Sokolowski et al., 2020). The qPCR analysis was conducted only on the 2021 samples. The results suggest that livers and gills could be submitted to an important oxidative stress (sod_{Cu} and sod_{Mn} inductions), biomarkers reflecting pollution of freshwater ecosystems (Ahmad et al., 2006). Oxidative stress could then be responsible of the mitochondrial dysfunction observed with an alteration of the mitochondrial respiratory chain (MRC) in liver and spleen (*12S* and *atp6-8* depletions). These results are highlighted by the PCA analysis conducted on the liver (Fig. 8), which demonstrated a clear link between oxidative stress, lipid metabolism and bioaccumulation of Ni, Mn, Cr and to a lesser extent Co. In New Caledonia, just one study noted an alteration of mitochondrial metabolism on goldfish after Ni exposition (Garceau et al., 2010), such as in Pacific eels in the present study. These effects were associated to a dysregulation of lipid metabolism (Prakash et al., 2017; Kroemer et al., 2007), as can be illustrated in our study by an induction of *gapdh* and *tgf* in livers and kidneys, markers of an increased utilization of glucose and triglycerides, which has previously been demonstrated in the European eel *Anguilla anguilla* after Cd exposure (Pierron et al., 2007). This alteration could compromise the efficiency of lipid storage necessary for their migration, and then, their reproductive success. Furthermore, studies also suggested that triglyceride catabolism is a biomarker of oxidative stress in eels (Naour et al., 2017) and could explain the lower hepato-somatic index of eels living under mining influence (Geeraerts and Belpaire, 2010). In addition, we observed a decrease in the precursor of egg yolk, *vtg*, in the liver, which could be a consequence of the lipid metabolism disruption and the oxidative stress observed (Burzawa-Gerard et al., 2008). Reproductive impairment in eels living in polluted waters has already been reported in previous studies (Pierron et al., 2008). We have to note that despite our sampling efforts, we failed to obtain fish of similar sizes among sampling sites. This can be explained either by an effect of metals on fish growth rate or by variations in fish age among sites (Patey et al., 2018). However, even if we cannot exclude an effect of age or sex, we observed a significant link between metal concentrations in liver, hepato-somatic index and *vtg* transcription levels, which suggests that contamination has probably an impact on reproduction and/or sex determination (Davey and Jellyman, 2005; Geffroy and Bardonnnet, 2016).

Another important fact is that eels living in contaminated freshwaters seem to have an important inflammation with *nlr3* depletion in livers. On the contrary, an induction of *nlr3* observed in kidneys indicate a decrease of pro-inflammatory response leading to a decrease of response if eels are in contact with virus, parasites or bacteria with potentially serious consequences about their health condition (Xie and Belosevic, 2018; Chang et al., 2021).

Finally, the transcriptomic studies showed in liver and gills, a potential initiation of carcinogenic pathways by down-regulating the transcription levels of genes involved in apoptosis and DNA repair (*gadd45*, *p53* and *bax*). Indeed, the carcinogenic effects of metals in fish liver were already reported in *Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata* (Usero et al., 2004; Turan et al., 2020). In contrast, the apoptosis pathway seemed activated in kidneys (*bax* induction) with DNA repair, also reported in brain (*gadd45* induction). The induction of apoptosis can remove potentially harmful cells, thereby blocking tumor growth (Pistritto et al., 2016). The kidneys may have activated this cell death

process to protect against toxic effects of metal contamination. Muscle were less impacted than other organs, accordingly to bioaccumulation observations.

In New Caledonia, the mining activities seem then to alter the quality of life of eels living in the rivers downstream the mines, by organ function alteration, especially the liver. Due to the importance of liver function for eels, metallic contamination could contribute to hepatic dysfunctions leading to impairment of lipid metabolism and could then alter the success of their migration and maturation and, potentially their reproduction.

5. Conclusion

The current study shows that metal concentrations observed in freshwater downstream mining sites may induce alterations of *Anguilla marmorata* organs in New Caledonia. Disruption of Fulton and hepato-somatic index might be explained by the high metals levels found in kidneys and livers of eels. In addition, metals triggered an important liver, kidneys and gills toxicity through the induction of mitochondrial dysfunction, oxidative stress, inflammation, immunotoxicity and apoptosis or carcinogenic effects. Therefore, the exposition of *Anguilla marmorata* to metals such as Ni, Cr, Co and Mn in New Caledonia because of open pit mining activities on ultramafic basin catchments may put the fish at risk of developing impaired migration and reproduction.

CRedit authorship contribution statement

Germande Ophélie: Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Visualization, Writing – original draft. **Gunkel-Grillon Peggy:** Methodology, Writing – review & editing. **Dominique Yannick:** Methodology, Writing – review & editing. **Emilie Bierque:** Methodology, Writing – review & editing. **Daffe Guillemine:** Methodology, Writing – review & editing. **Dassié Emilie:** Methodology, Writing – review & editing. **Pierron Fabien:** Methodology, Writing – review & editing. **Baudrimont Isabelle:** Project administration, Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Baudrimont Magalie:** Project administration, Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We want to thank the CNRT-Nickel and its environment for fundings of QUAVAR and DMML projects (New Caledonia) and the Bioeko private company for sampling eels by electric fishing in rivers, according to New Caledonia authorizations.

References

- Couture, P., Busby, P., Gauthier, C., Rajotte, J.W., Pyle, G.G., 2008. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14, 97–125.
- Javed, M., Usmani, N., 2013. Assessment of heavy metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) pollution in effluent dominated rivulet water and their effect on glycogen metabolism and histology of *Mastacembelus armatus*. Springerplus 2.
- Pierron, F., Bourret, V., St-Cyr, J., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology* 18, 620–631.
- Younger, P.L., 2001. Mine water pollution in Scotland: nature, extent and preventative strategies. *Sci. Total Environ.* 265, 309–326.

- Singh, A.N., Zeng, D.H., Chen, F.S., 2005. Heavy metal concentrations in redeveloping soil of mine spoil under plantations of certain native woody species in dry tropical environment, India. *J. Environ. Sci. (China)* 17, 168–174.
- Ashraf, M.A., Wajid, A., Mahmood, K., Maah, M.J., Yusoff, I., 2011a. Removal of heavy metals from aqueous solution by using mango biomass. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2163–2177.
- Ashraf, M.A., Maah, M.J., Yusoff, I., 2011b. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 8, 401–416.
- Nouri, J., Mahvi, A.H., Jahed, G.R., Babaei, A.A., 2008a. Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities. *Environ. Geol.* 55, 1337–1343.
- Nouri, J., Karbassi, A.R., Mirkia, S., 2008b. Environmental management of coastal regions in the Caspian Sea. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 43–52.
- Isnard, S., L'huillier, L., Rigault, F., Jaffré, T., 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant Soil* 403, 53–76.
- Losfeld, G., L'huillier, L., Fogliani, B., Jaffré, T., Grison, C., 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5592–5607.
- Ambatsian, P., Fernex, F., Bernat, M., Parron, C., Lecolle, J., 1997. High metal inputs to closed seas: The New Caledonian lagoon. *J. Geochem. Explor.* 59, 59–74.
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140.
- Pasquet, C., Monna, F., van Oort, F., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Losno, R., Chateau, C., 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* 190, 638.
- Boula, A., Laporte-Magoni, C., Gunkel-Grillon, P., Bour, O., Selmaoui-Folcher, N., 2022. Potential contamination of stream waters by ultramafic mining sediments: Identification of geochemical markers (New Caledonia). *J. Geochem. Explor.* 232.
- Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Lemestre, M., Bazire, N., 2014. Toxic chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia. *Environ. Chem. Lett.* 12, 511–516.
- Fry, K.L., Gillings, M.M., Isley, C.F., Gunkel-Grillon, P., Taylor, M.P., 2021. Trace element contamination of soil and dust by a New Caledonian ferronickel smelter: Dispersal, enrichment, and human health risk. *Environ. Pollut. (Barking, Essex: 1987)* 288.
- Kettle, C.J., Hollingsworth, P.M., Jaffré, T., Moran, B., Ennos, R.A., 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Mol. Ecol.* 16, 3581–3591.
- Hedouin, L., Pringault, O., Metian, M., Bustamante, P., Warnau, M., 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. *Chemosphere* 66, 1449–1457.
- Bonnet, X., Briand, M.J., Brischoux, F., Letourneur, Y., Fauvel, T., Bustamante, P., 2014. Anguilliform fish reveal large scale contamination by mine trace elements in the coral reefs of New Caledonia. *Sci. Total Environ.* 470–471, 876–882.
- van der Oost, R., V.P. N. B.J., 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Barak, N.A., Mason, C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead in eels and roach: the effects of size, season and locality on metal concentrations in flesh and liver. *Sci. Total Environ.* 92, 249–256.
- Durrieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., Rochard, E., Boudou, A., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28, 581–591.
- Van Ginneken, V., Maes, G., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 15, 367–398.
- Boetius, I., Boetius, J., 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *DANA* 1.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloché, S., Mesmer-Dudons, N., Gonzalez, P., Bourdineaud, J.P., Massabuau, J.C., 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4607–4612.
- Castro, D., Miei, C.L., Coelho, J.P., Guilherme, S., Marques, A., Santos, M.A., Duarte, A.C., Pereira, E., Pacheco, M., 2018. Addressing the impact of mercury estuarine contamination in the European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) - An early diagnosis in glass eel stage based on erythrocytic nuclear morphology. *Mar. Pollut. Bull.* 127, 733–742.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.P., Brethes, D., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81, 304–311.
- Buttermore, E.N., Cope, W.G., Kwak, T.J., Cooney, P.B., Shea, D., Lazaro, P.R., 2018. Contaminants in tropical island streams and their biota. *Environ. Res.* 161, 615–623.
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2009. Condition and pyloric caeca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 2066–2074.
- Qian, Y., Cheng, C., Feng, H., Hong, Z., Zhu, Q., Kolencik, M., Chang, X., 2020. Assessment of metal mobility in sediment, commercial fish accumulation and impact on human health risk in a large shallow plateau lake in southwest of China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 194, 110346.
- Perrier, F., Bertucci, A., Pierron, F., Feurteit-Mazel, A., Simon, O., Klopp, C., Candaup, F., Pokrovski, O., Etcheverria, B., Mornet, S., Baudrimont, M., 2020. Transfer and Transcriptomic Profiling in Liver and Brain of European Eels (*Anguilla anguilla*) After Diet-borne Exposure to Gold Nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 39, 2450–2461.
- Coppe, A., Pujolar, J.M., Maes, G.E., Larsen, P.F., Hansen, M.M., Bernatchez, L., Zane, L., Bortoluzzi, S., 2010. Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered European eel. *BMC Genom.* 11, 635.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71–W74.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402–408.
- McHugh, M.L., 2011. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem Med (Zagreb)* 21, 203–209.
- Bolger, T., Connolly, P.L., 1989. The Selection of Suitable Indexes for the Measurement and Analysis of Fish Condition. *J. Fish. Biol.* 34, 171–182.
- Wood, C.M., Grosell, M., Hogstrand, C., Hansen, H., 2002. Kinetics of radiolabelled silver uptake and depuration in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European eel (*Anguilla anguilla*): the influence of silver speciation. *Aquat. Toxicol.* 56, 197–213.
- Calmano, W., Hong, J., Forstner, U., 1993. Binding and Mobilization of Heavy-Metals in Contaminated Sediments Affected by Ph and Redox Potential. *Water Sci. Technol.* 28, 223–235.
- Walling, D.E., Owens, P.N., Carter, J., Leeks, G.J.L., Lewis, S., Meharg, A.A., Wright, J., 2003. Storage of sediment-associated nutrients and contaminants in river channel and floodplain systems. *Appl. Geochem.* 18, 195–220.
- A.J. Lawrence, K. Hemingway, **Effects of pollution on fish: molecular effects and population responses**, Blackwell Science, Oxford; Ames, Iowa, 2003.
- Elliott, M., Griffiths, A.H., Taylor, C.J.L., 1988. The Role of Fish Studies in Estuarine Pollution Assessment. *J. Fish. Biol.* 33, 51–61.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Salgado, M.A., 2007. Bioaccumulation of heavy metals in *Liza saliens* from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 426–431.
- Palaniappan, P.L., Karthikeyan, S., 2009. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. *J. Environ. Sci. (China)* 21, 229–236.
- Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P.G.C., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel (*Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). *Sci. Total Environ.* 569–570, 1435–1445.
- Imbrogio, S., 2013. The eel heart: multilevel insights into functional organ plasticity. *J. Exp. Biol.* 216, 3575–3586.
- van Ginneken, V.J., van den Thillart, G.E., 2000. Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403, 156–157.
- Sow, A.Y., Ismail, A., Zulkifli, S.Z., 2013. An assessment of heavy metal bioaccumulation in Asian swamp eel, *Monopterus albus*, during plowing stages of a paddy cycle. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 6–12.
- Souza, L.D.C., Morozeski, M., Bonomo, M.M., Azevedo, V.C., Sakuragui, M.M., Elliott, M., Matsumoto, S.T., Wunderlin, D.A., Baroni, M.V., Monferran, M.V., Fernandes, M.N., 2018. Differential biochemical responses to metal/metalloid accumulation in organs of an edible fish (*Centropomus parallelus*) from Neotropical estuaries. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 260–269.
- Gordeeva, A.V., Zvyagil'skaya, R.A., Labas, Y.A., 2003. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry. Biokhimiia* 68, 1077–1080.
- Madreiter-Sokolowski, C.T., Thomas, C., Ristow, M., 2020. Interrelation between ROS and Ca²⁺ in aging and age-related diseases. *Redox biology*, 36, 101678.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952–962.
- Garceau, N., Pichaud, N., Couture, P., 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat. Toxicol.* 98, 107–112.
- Prakash, Y.S., Pabelick, C.M., Sieck, G.C., 2017. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest* 152, 618–626.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.
- Naour, S., Espinoza, B.M., Aedo, J.E., Zuloaga, R., Maldonado, J., Bastias-Molina, M., Silva, H., Meneses, C., Gallardo-Escarate, C., Molina, A., Valdes, J.A., 2017. Transcriptomic analysis of the hepatic response to stress in the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*): Insights into lipid metabolism, oxidative stress and liver steatosis. *PLoS One* 12, e0176447.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239–266.
- Burzawa-Gerard, S.B.E., Leloup-Hatey, J., Le Menn, F., Messaoui, H., Nunez-Rodriguez, J., Peyon et C. Roger, P., 2008. Oogenesis in the eel (*Anguilla anguilla* L.): oocyte ultrastructure at different stages of development and role played by lipoproteins during vitellogenesis. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 335, 213–233.
- Patey, G., Couillard, C.M., Drouineau, H., Verreault, G., Pierron, F., Lambert, P., Baudrimont, M., Couture, P., 2018. Early back-calculated size-at-age of Atlantic yellow eels sampled along ecological gradients in the Gironde and St. Lawrence hydrographical systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 75, 1270–1279.
- Davey, A.J.H., Jellyman, D.J., 2005. Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 15, 37–52.
- Geffroy, B., Bardonnat, A., 2016. Sex differentiation and sex determination in eels: consequences for management. *Fish Fish* 17, 375–398.
- Xie, J., Belosevic, M., 2018. Characterization and functional assessment of the NLR3-like molecule of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 79, 1–10.
- Chang, M.X., Xiong, F., Wu, X.M., Hu, Y.W., 2021. The expanding and function of NLR3 or NLR3-like in teleost fish: Recent advances and novel insights. *Dev. Comp. Immunol.* 114, 103859.

Usero, J., Izquierdo, C., Morillo, J., Gracia, I., 2004. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environ. Int.* 29, 949–956.

Turan, F., Karan, S., Ergenler, A., 2020. Effect of heavy metals on toxicogenetic damage of European eels *Anguilla anguilla*. *Environ. Sci. Pollut. R.* 27, 38047–38055.

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D’Orazi, G., 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 8, 603–619.

<https://www.historique-meteo.net/oceanie/nouvelle-caledonie/2016/MeteoNC>, 2016.

<https://www.historique-meteo.net/oceanie/nouvelle-caledonie/2021/MeteoNC>, 2021.

Résumé et conclusion :

Cette étude nous a permis, pour la première fois, de voir quelles étaient les conséquences pour les anguilles marbrées de vivre dans des rivières contaminées par les métaux en raison de la présence d'exploitations minière en Nouvelle-Calédonie, notamment au niveau du Mont Koniambo.

Tout d'abord, nous avons observé que les anguilles prélevées en 2016 et 2021, vivant sous influence minière, sont plus petites et ont un indice hépato-somatique plus faible, reflétant une altération de la fonction hépatique. En revanche, l'indice de Fulton ne diffère entre les anguilles vivant sous influence minière et celles prélevées sur le site de référence qu'en 2016 où il diminue. Ceci peut être expliqué par les différences des conditions météorologiques avec des pluies bien plus importantes en 2021 qu'en 2016, entraînant une modification de la biodisponibilité du Ni. En effet, lors de pluies importantes, le taux de matières en suspension est plus important dans l'eau, ce qui augmente la fraction particulaire du métal par rapport à la fraction dissoute et entraîne en parallèle une dilution de la fraction dissoute. Au contraire, en 2016, la concentration dissoute en Ni est plus élevée ce qui peut affecter toute la chaîne alimentaire et jouer sur la quantité et la qualité de la nourriture ingérée par les anguilles des rivières polluées.

En ce qui concerne la concentration en métaux dans les organes, les mêmes tendances ont été observées aux deux périodes de prélèvement, sauf pour les foies et les branchies. En 2016, les anguilles de la rivière Taléa sont plutôt contaminées via la voie des métaux dissous dans l'eau vu que les branchies sont les organes les plus accumulateurs pour le Ni et le Cr. Au contraire, en 2021, les reins et le foie sont les organes accumulant le plus les métaux, indiquant une contamination plutôt via la voie trophique. Ceci est observé pour le Co également. Ces résultats sont cohérents avec les conditions météorologiques décrites précédemment. En revanche, pour le Mn, aux deux périodes d'étude, ce sont les branchies qui bioaccumulent le plus cet élément. Nous avons également mis en évidence une accumulation significative du Ni, Co et Mn dans les cœurs des anguilles de Taléa en 2021, signe d'une cardiotoxicité potentielle. Enfin, nous pouvons exclure le risque pour la consommation humaine des anguilles car les muscles semblent peu, ou pas, accumuler les métaux, et les concentrations retrouvées sont inférieures aux recommandations pour la santé humaine.

En termes de modulation de l'expression génique, les résultats suivent les mêmes tendances dans le foie et les branchies qui sont les organes les plus impactés. En effet, un important stress oxydant est suggéré (induction des *sod_{cu}* et *sod_{mn}*) qui pourrait être responsable des

altérations mitochondriales et lipidiques observées au niveau hépatique (déplétion de *12s* et *atp6-8* et *AcCoa* et induction de *gapdh* et *tgl*), signant un catabolisme des triglycérides trop important et, ainsi, une moins bonne qualité de stockage des lipides. Nous remarquons également une altération du niveau de transcription de la *vg*. Enfin, les études transcriptomiques ont montré dans ces deux organes, une initiation potentielle des voies cancérigènes, observée par la régulation à la baisse des niveaux de transcription des gènes impliqués dans l'apoptose et la réparation de l'ADN (*gadd45*, *p53* et *bax*). Au contraire, dans les reins et le cerveau, les voies de l'apoptose semblent être activées. Enfin, les anguilles de Taléa semblent présenter une inflammation hépatique importante avec une déplétion de *nirc3* alors que dans les reins ce gène est induit, indiquant une diminution de la réponse pro-inflammatoire.

Une analyse en composante principale de toutes ces réponses (biométrie, bioaccumulation métallique et expression des gènes) a permis de mettre en évidence un lien entre les altérations transcriptomiques et les concentrations en métaux retrouvés dans le foie, suggérant une atteinte toxique de cet organe.

En Nouvelle-Calédonie, les activités minières semblent donc altérer la qualité de vie des anguilles vivant dans les rivières en aval des mines, par une altération fonctionnelle de plusieurs organes, en particulier le foie, ce qui pourrait contribuer à une altération du métabolisme lipidique et, ainsi, altérer le succès de leur migration et maturation et donc potentiellement leur reproduction. Néanmoins, sachant que les cours d'eau sous influence minière représentent moins d'un tiers des cours d'eau calédoniens, il est peu probable que cet effet local soit retrouvé à l'échelle de la population.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Partie 1 : Conclusion générale

Les différentes études menées au cours de ce travail ont permis d'apporter de nouvelles connaissances mécanistiques sur les potentiels impacts sanitaires et environnementaux de l'exploitation minière de Ni en Nouvelle-Calédonie en répondant à deux objectifs principaux.

Le premier axe de recherche vise à étudier le mécanisme d'action toxique des NPs de NiO. Pour répondre à cet objectif nous avons choisi deux modèles cellulaires différents, cibles privilégiées des NPs de NiO, les cellules HPAEC et HEPA-E1.

Les HPAEC constituent, en effet, des cibles des NPs après inhalation par les travailleurs et les populations environnantes. Les HEPA-E1, quant à elles, peuvent être en contact avec ces NPs après exposition des anguilles *in situ* soit à partir de la voie directe à travers les branchies, puis distribution dans le sang, soit via la consommation de proies préalablement contaminées. De plus, ces cibles cellulaires nous permettent d'apprécier un éventuel risque pour la population humaine de développer des pathologies cardiovasculaires et pour la population d'anguilles d'avoir une altération de la fonction hépatique, ce qui pourrait compromettre la qualité de leur migration et donc de leur reproduction.

Les différentes études réalisées ont permis de mettre en évidence un mécanisme d'action toxique des NPs de NiO en partie commun aux deux types cellulaires. En effet, nous avons, dans un premier temps, montré que ces NPs étaient internalisées sous forme d'agrégats cytoplasmiques, assez proches du noyau et des mitochondries. Une fois internalisées, les NPs de NiO sont capables de générer un important stress oxydant, d'une part, en induisant la production d'ERO radicalaires, cytoplasmiques et mitochondriales et, d'autre part, en inhibant l'activité des enzymes de défense anti oxydantes telles que les SOD. Ce stress oxydant active ensuite les voies de l'inflammation en induisant une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-6, marqueurs de pathologies cardiovasculaires dans les HPAEC et d'altérations hépatiques dans les HEPA-E1. Nous avons, ensuite, observé, dans les deux types cellulaires, une altération de l'homéostasie calcique ainsi que des altérations mitochondriales qui, contrairement aux résultats précédents concernant le stress oxydant et l'inflammation, diffèrent pour chacun des types cellulaires. Les différences observées sont probablement dues à la spécificité fonctionnelle et physiologique des cellules. En ce qui concerne les HPAEC, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes à l'origine des altérations de l'homéostasie calcique en raison du rôle clef du calcium dans la physiologie vasculaire et, notamment, dans le contrôle de la relaxation et de la contraction

cellulaire. Nous avons ainsi pu montrer que les NPs de NiO, d'une part, inhibaient l'activité des canaux calciques membranaires TRPV4, impliqués, notamment, dans le déclenchement de pathologies cardiovasculaires et, d'autre part, altéraient la production et la sécrétion de NO et d'ET-1, deux marqueurs de l'HTP.

En ce qui concerne les HEPA-E1, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mitochondries, lieu de la métabolisation des lipides et avons mis en évidence une altération de la CRM et de l'expression des enzymes du métabolisme lipidique suggérant un dysfonctionnement dans le métabolisme des triglycérides. Nos résultats suggèrent ainsi que le stockage des lipides est peu, ou pas efficace. Se pose, ainsi, la question de la qualité de la migration et de la reproduction des anguilles avec une fonction mitochondriale hépatique altérée.

Nous pouvons, ainsi, conclure que, malgré quelques différences dans les mécanismes à l'origine de l'altération calcique et mitochondriale, les NPs de NiO présentent une toxicité commune conduisant ensuite les cellules vers la voie de mort cellulaire par apoptose. Les différentes voies de toxicité communes sont résumées dans la figure 49. Il est, également, intéressant de souligner que, même si pour certaines expérimentations les NPs de NiO présentent des effets toxiques dès $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, pour toutes les études, les effets toxiques sont essentiellement observés à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette concentration est réaliste car elle reflète la concentration en Ni dans les PM_{10} lors des pics de pollution à Nouméa. A cette concentration, les PM_{10} peuvent, en effet, être inhalées par les travailleurs miniers ainsi que les populations environnantes ou sédimenter dans les cours d'eau douce. Les teneurs en Ni dans les PUF et / ou $\text{PM}_{2.5}$ ne sont pas mesurées en Nouvelle-Calédonie mais nous pouvons supposer que ces concentrations en Ni sont similaires, voire supérieures, à celles retrouvées dans les PM_{10} .

Par ailleurs, pour compléter les études mécanistiques *in vitro*, il nous a semblé opportun de comparer les effets des NPs de NiO, représentant principalement la pollution due à l'activité minière, aux effets observés après exposition des cellules à des polluants naturellement présents en Nouvelle-Calédonie, à savoir, d'une part, les sels de nickel NiCl_2 retrouvés dans l'eau et, d'autre part, les latérites nickélifères remises en suspension dans l'atmosphère. Ces différentes études ont, ainsi, pu montrer que le principal risque pour les populations locales et les organismes aquatiques semble venir d'une exposition aux NPs de NiO émises par les exploitations minières, plus que par le Ni naturellement présent dans les sols.

- Mécanismes communs
- Spécificités sur les HPAEC
- Spécificités sur les HEPA-E1

- SOD : Superoxyde dismutase
- TRPV4 : Transient receptor potentiel vanilloïde 4
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- O₂⁻ : Anion superoxyde
- [Ca²⁺]_{ic} : concentration calcique cytoplasmique
- [Ca²⁺]_{re} : concentration calcique réticulaire
- [Ca²⁺]_m : concentration calcique mitochondriale
- ΨMP : potentiel de membrane mitochondriale
- AcCoa : Acetyl Coa carboxylase
- Atp6-8 : Adenosine triphosphate 6-8
- Cox : cyclo-oxygénase
- CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
- Casp9 : caspase 9
- Bax : Bcl-2-associated X protein
- IL-6 : Interleukines-6
- ET-1 : Endothéline-1
- NO : Monoxyde d'azote

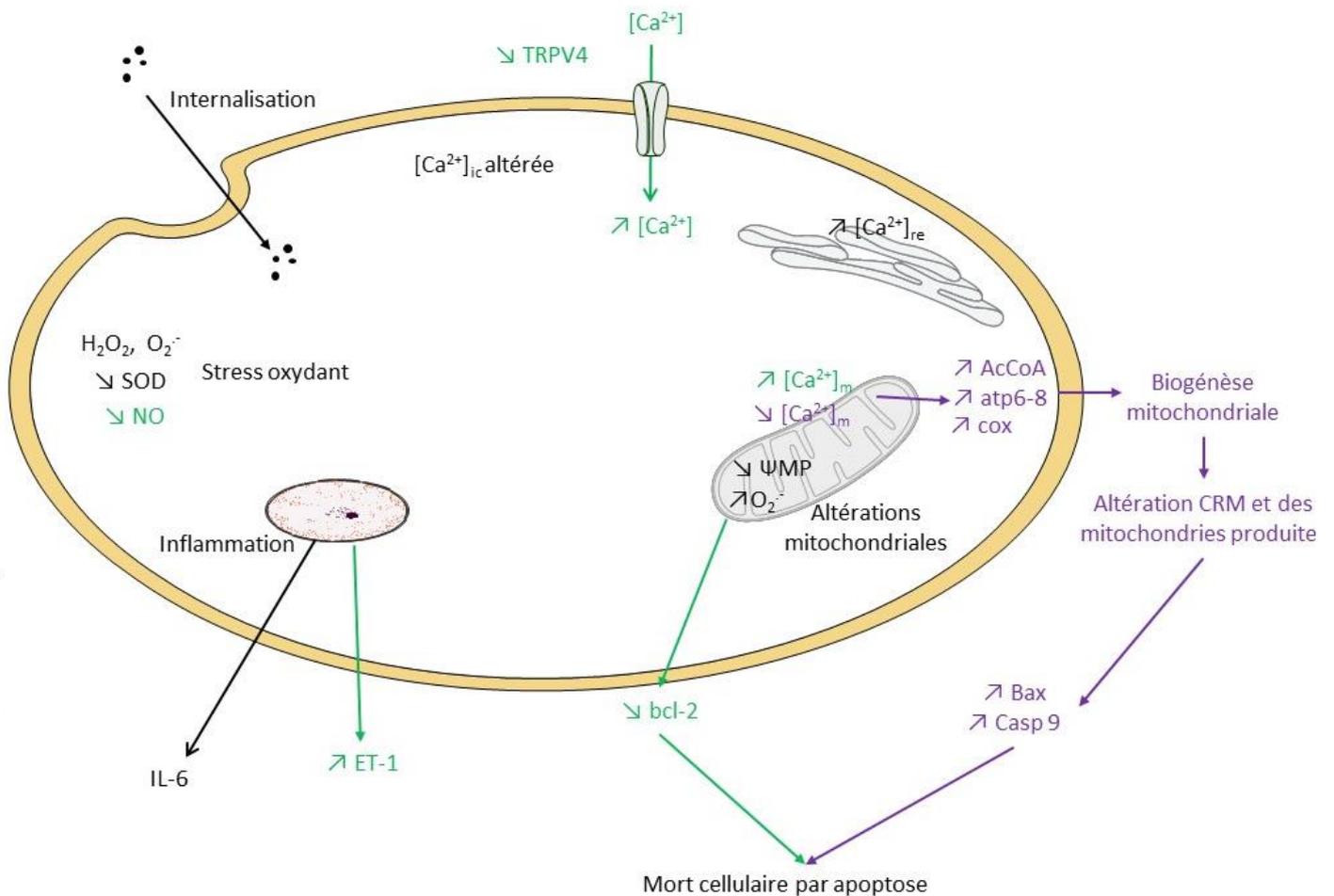


Figure 49 : Schéma de conclusion générale, mécanisme d'action toxique des NPs de NiO

Le second axe de cette Thèse consiste en une approche plus fonctionnelle tant en écotoxicologie qu'en toxicologie humaine. En effet, il paraît essentiel, après avoir étudié et élucidé les mécanismes moléculaires et biologiques à l'origine de la toxicité des NPs de NiO, de transposer nos observations à de la recherche fonctionnelle. Ce type d'approche nous a permis d'apprécier le risque sanitaire et environnemental suite à ces expositions, d'une part, en se rapprochant de la réalité et des conditions observées *in vivo* via l'utilisation de modèles pathologiques, et, d'autre part, en réalisant une étude et des prélèvements *in situ* en Nouvelle-Calédonie.

En toxicologie humaine, un de nos objectifs a été de comparer les effets des NPs de NiO en conditions physiologiques et pathologiques mimant la dynamique et l'environnement vasculaire observés dans l'HTP, grâce à un modèle *in vitro* innovant se rapprochant des conditions observées *in vivo* sur les CE en cas d'HTP. Pour cela, les cellules sont soumises à un étirement de 20 % et sont placées en hypoxie (1 % d'O₂) pour mimer, d'une part, l'augmentation de la tension des vaisseaux observée dans l'HTP, et, d'autre part, l'environnement hypoxique de l'HTP. Nos résultats montrent qu'en conditions pathologiques, tous les effets toxiques des NPs de NiO sont amplifiés. En effet, le stress oxydant, l'inflammation, la production de nitrites et nitrates, les altérations mitochondriales et calciques sont significativement plus importants lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions mimant l'HTP. Nous pouvons ainsi conclure qu'une exposition accrue et chronique aux NPs de NiO, par inhalation, pourrait aggraver certains événements physiopathologiques chez des populations présentant une pathologie cardiovasculaire préexistante avec une dysfonction endothéliale telle que l'HTP et que ces populations seraient plus sensibles aux polluants particuliers.

En écotoxicologie, une étude *in situ* a été réalisée lors d'une mission en Nouvelle-Calédonie en juillet 2021. Des anguilles marbrées, *Anguilla marmorata*, ont été pêchées dans 4 sites différents, 3 plus ou moins impactés par l'activité minière le long de la rivière Taléa située sur substrat ultramafique, et 1 site sur la rivière Tivoli aval, considérée comme référence localisée sur substrat volcano-sédimentaire en surface. Il a été montré que les anguilles vivant dans la Taléa présentaient des altérations morphologiques et génétiques en comparaison aux individus de la Tivoli aval. En effet, les anguilles des rivières polluées sont plus petites, avec un plus faible indice hépato-somatique révélant une altération hépatique, en partie confirmée par les taux en Ni, Cr et Co plus importants dans les foies de ces anguilles. Cependant, nous avons montré que les reins semblaient être les organes les plus bioaccumulateurs, ce qui suggère une difficulté d'élimination de ces éléments métalliques après leur absorption.

L'altération hépatique a été confirmée par les études transcriptomiques qui ont montré que les métaux induisaient un stress oxydant, une dysfonction mitochondriale, une dérégulation du métabolisme lipidique, une altération de l'hormone de reproduction ainsi qu'un phénomène inflammatoire et cancérigène. Les mêmes tendances sont observées dans les branchies. Les reins, quant à eux, malgré une bioaccumulation plus importante des métaux, semblent moins altérés. Quelques modifications des gènes impliqués dans l'apoptose sont cependant observées probablement comme mécanisme de défense pour diriger les cellules altérées vers la mort cellulaire via la voie de l'apoptose afin d'éviter le déclenchement des mécanismes cancérigènes. Des corrélations ont d'ailleurs été réalisées et ont démontré le lien entre les altérations hépatiques, les concentrations en métaux et les perturbations géniques. Cette étude nous a permis de montrer que l'exposition d'*Anguilla marmorata* aux métaux déclenche une importante toxicité hépatique, branchiale et rénale. Les principaux effets observés sur les *A. marmorata* sont schématisés sur la figure 50.

De plus, il est intéressant à ce stade de comparer nos résultats *in vivo* et *in vitro* sur les HEPA-E1. En effet, il a été mis en évidence un stress oxydant important par les deux approches, ainsi qu'une altération de la fonction mitochondriale. Cependant, les mécanismes diffèrent légèrement. En effet *in vitro*, il est observé une activation des voies de mort cellulaire par apoptose, ce qui n'est pas le cas *in vivo*. Néanmoins les HEPA-E1 n'ont été exposées qu'avec les NPs de NiO alors que les *Anguilla marmorata* sont exposées à un mélange de métaux. Les études *in situ* complètent, également, celles réalisées *in vitro* en apportant les données morphométriques, de dosages des métaux et les effets sur la reproduction qui n'avaient pas pu être mis en évidence *in vitro*. Nous voyons ainsi les limites des modèles cellulaires *in vitro*, qui permettent plutôt de décrypter une mécanistique toxique à un polluant donné ou à un mélange de polluants, sur du court terme, mais qui ont besoin d'être complétés par les études *in situ* pour se rapprocher des conditions naturelles dans lesquelles les individus sont exposés, plutôt sur du long terme. Ainsi, l'exposition d'*Anguilla marmorata* aux métaux tels que le Ni, le Cr, le Co et le Mn en raison des activités minières en Nouvelle-Calédonie peut être néfaste pour les anguilles et induire chez cette espèce des troubles de la migration et de la reproduction pouvant potentiellement conduire au déclin de cette population.

S: Stress oxydant
 A: Apoptose
 L: Métabolisme des lipides
 M: Métabolisme mitochondrial
 R : Reproduction
 C : Cancérogenèse
 I : Inflammation

+ : Stimulé
 - : Inhibé

-  Muscles
-  Reins
-  Gonade
-  Branchies
-  Cerveau
-  Foie

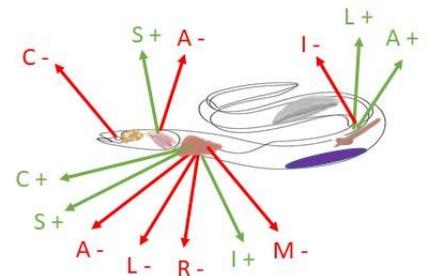
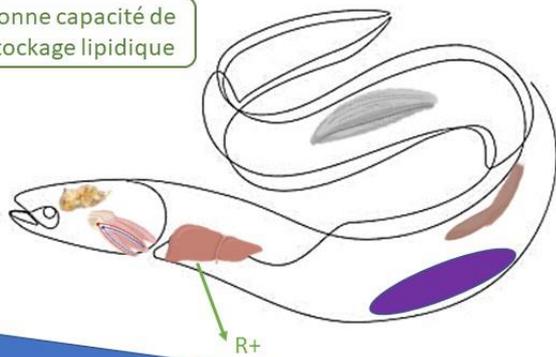


Rivières non soumises
 aux influences
 minières, ex : Tivoli

Rivières sous influence
 minière, ex : Taléa

NPs de NiO, Ni, Cr, Co, Mn

Bonne capacité de
 stockage lipidique



Migration et reproduction
 probablement impactées

Taille, Indice de Fulton, Indice hépato-somatique

Figure 50 : Schéma de conclusion sur les effets des métaux sur les anguilles marbrées en Nouvelle-Calédonie

En conclusion générale, l'ensemble de ces résultats nous a permis d'appréhender les risques pour les calédoniens et pour les populations d'anguilles, liés aux exploitations minières de Ni. Les concentrations en nickel dans l'atmosphère ou dans les eaux sont bien supérieures aux réglementations Françaises et Européennes. En effet, à cause de la composition des sols calédoniens il paraît, aujourd'hui, difficile pour la Nouvelle-Calédonie de respecter ces seuils. Il serait alors peut-être judicieux et intéressant d'adapter les seuils réglementaires à ne pas dépasser sur l'île en fonction des caractéristiques géologiques du pays. Pour l'air, il semble compliqué de respecter la DE 2004/107/CE de 20 ng/m³ sur l'année, et pour les cours d'eau douce de respecter la NQE de 4 µg/L de Ni dans les eaux de rivières. Il serait nécessaire de déterminer et proposer une concentration en Ni dans l'air et dans les eaux qui n'entraîne pas ou peu d'effet sur les espèces aquatiques et sur l'Homme. Grâce à l'étude *in situ*, en ce qui concerne les cours d'eau douce, il a cependant pu être mis en évidence que dans les rivières éloignées des mines, comme Tivoli, malgré des valeurs de Ni dans l'eau supérieures à la NQE (entre 7 et 15 µg/L à Tivoli), les anguilles semblaient être peu impactées par les métaux. En revanche, dans les rivières sous influence minière, même les plus éloignées des mines telle que Taléa aval où les taux sont en moyenne de 60 µg/L de Ni total, les *A. marmorata* commencent à avoir des altérations géniques et morphométriques. Bien que des premières données soient apportées par nos travaux, des études complémentaires sont bien sûr nécessaires afin de déterminer les taux, non toxiques, à respecter pour les organismes aquatiques situés à différents niveaux de la chaîne trophique en Nouvelle-Calédonie, et ceci, en conditions contrôlées de laboratoire *in vivo*.

Les exploitations minières, malgré le poids et l'enjeu économique qu'elles représentent, auront des conséquences désastreuses sanitaires et environnementales si rien n'est mis en place pour encadrer et surveiller les concentrations en Ni dans l'environnement. Les effets potentiels sur le système vasculaire pulmonaire humain et les anguilles sont résumés dans le schéma de conclusion générale (figure 51).

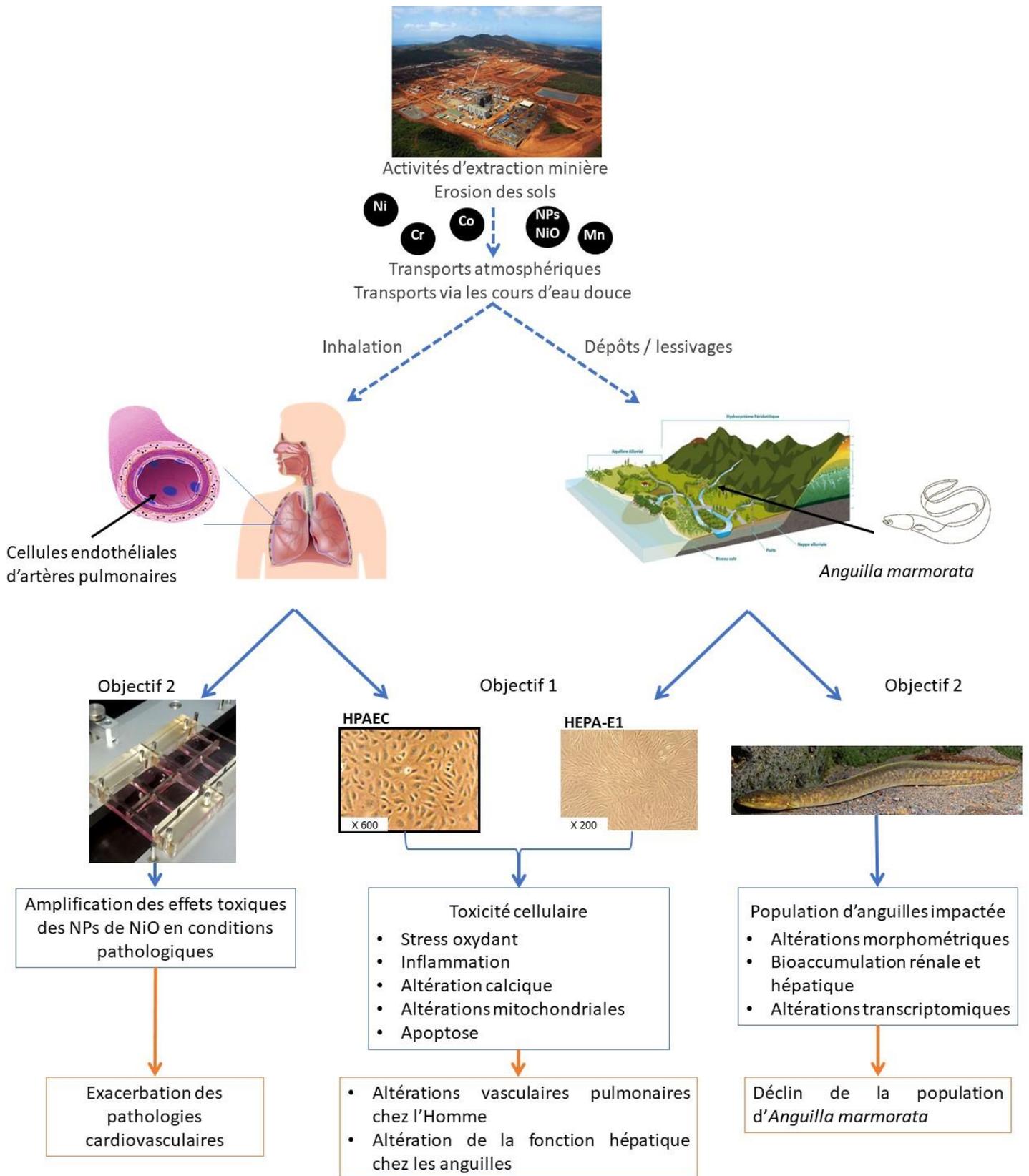


Figure 51 : Schéma de conclusion finale sur les principaux résultats de la Thèse

Partie 2 : Perspectives de recherches

Afin de poursuivre ce travail de Thèse, et ainsi approfondir nos connaissances sur la toxicité des NPs de NiO et autres métaux liés à l'activité minière en Nouvelle-Calédonie, à la fois pour l'Homme et l'Environnement, plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* sont envisageables.

Dans un premier temps, en santé humaine, il serait intéressant d'évaluer les effets indirects, sur les cellules HPAEC, des sécrétions épithéliales induites par les NPs de NiO au niveau de l'épithélium respiratoire. L'appareil respiratoire, en particulier les cellules épithéliales bronchiques, constitue la première cible des particules inhalées. Des études expérimentales récentes ont mis en évidence que l'effet principal d'une exposition aux particules est une inflammation respiratoire caractérisée notamment par la sécrétion par les cellules épithéliales respiratoires de médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines). Le sécrétome épithélial pourrait avoir un effet paracrine sur les CE vasculaires pulmonaires qui pourrait contribuer à la toxicité vasculaire des NPs. Il a, en effet, été évoqué le rôle délétère des médiateurs de l'inflammation sécrétés par les cellules épithéliales bronchiques, sur le système cardiovasculaire. Cependant, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets du sécrétome épithélial bronchique, issu de cellules épithéliales exposées aux NPs, sur des cellules vasculaires pulmonaires. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de mieux caractériser les effets indirects du sécrétome produit par les cellules épithéliales bronchiques exposées à des NPs de NiO, sur des HPAEC. Pour « mimer » ces effets indirects, des expositions uniques et/ou répétées de NPs de NiO sur des cellules épithéliales bronchiques (cellules NHBE, normal human bronchial epithelial cells, en interface air/liquide) pourraient être réalisées. Pour cela, les cellules épithéliales bronchiques peuvent être exposées aux NPs de NiO, puis les milieux de cultures (milieu basal) récupérés et mis en contact avec les cellules HPAEC (figures 52). Les effets indirects pourraient également être étudiés en utilisant des co-cultures des deux types cellulaires (cellules HPAEC et cellules épithéliales) (figure 53). Sur la base des résultats déjà obtenus dans ce travail de Thèse, il serait important d'évaluer, dans les cellules HPAEC, les effets délétères du sécrétome épithélial sur le stress oxydant, la réponse pro-inflammatoire, la signalisation calcique, la dysfonction mitochondriale et l'apoptose.

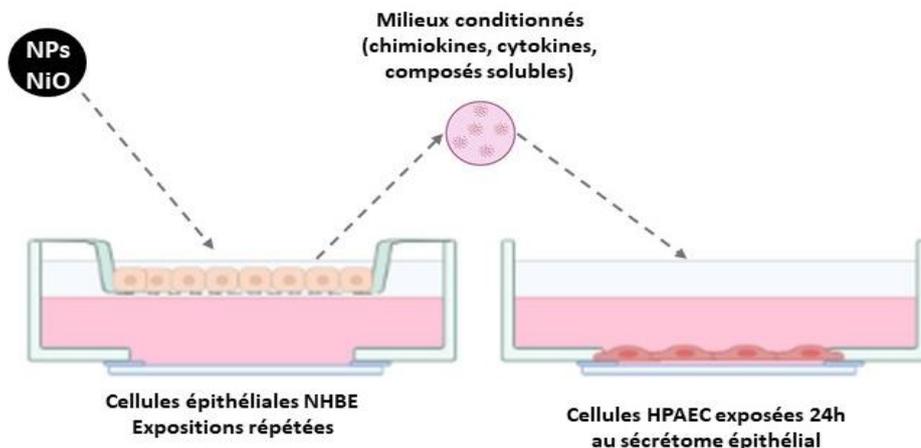


Figure 52 : Approche des milieux conditionnés. Intoxication des cellules épithéliales bronchiques. Exposition des cellules HPAEC aux milieux de culture (contenant les sécrétions épithéliales ainsi que les facteurs solubles adsorbés à la surface des particules).

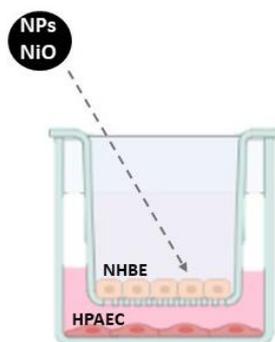


Figure 53 : Modèle de co-culture cellules HPAEC – NHBE. Intoxication des cellules épithéliales bronchiques avec les NPs de NiO en présence de cellules HPAEC

Afin de valider nos hypothèses observées *in vitro* sur les cellules HPAEC placées en conditions pathologiques et de confirmer si les NPs de NiO peuvent aggraver les altérations physiopathologiques observées dans l’HTP telles que l’hyperréactivité vasculaire, l’inflammation et le remodelage des artères pulmonaires, il serait, également, intéressant d’étudier l’impact de ces NPs, *in vivo*, chez le rat. De nombreux modèles animaux d’HTP sont développés, notamment les modèles d’HTP induite par l’hypoxie chronique dans lesquels les animaux sont placés en caisson hypobare pendant 3 semaines. Pour évaluer l’effet des NPs de NiO, *in vivo*, des rats normaux ou souffrant d’HTP seront exposés aux NPs de NiO en utilisant un système d’exposition par inhalation qui permet la nébulisation des NPs. Il sera intéressant d’évaluer chez les animaux sains ou souffrant d’HTP les effets des NPs de NiO sur les différentes altérations physiopathologiques observées dans l’HTP, à savoir, l’hyperréactivité, l’inflammation et le remodelage des artères pulmonaires.

L'ensemble de ces travaux, *in vitro*, et, *in vivo*, permettraient une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les NPs de NiO au niveau des cellules vasculaires pulmonaires, et d'évaluer si les altérations cellulaires induites par ces particules peuvent conduire, *in vivo*, à des altérations physiopathologiques.

En écotoxicologie, après avoir élucidé certains effets et impacts des NPs de NiO et autres métaux sur les anguilles, il serait intéressant, dans un premier temps, d'approfondir nos connaissances sur les effets chez les anguilles mais également de s'intéresser à d'autres maillons de la chaîne trophique.

Nous avons pu observer une altération du métabolisme lipidique chez les anguilles vivant dans des rivières sous influence minière, ainsi qu'une probable altération de la reproduction au vu de la modification de l'expression de la *vg*. Afin de comprendre comment les anguilles pourraient être impactées à long terme il serait donc judicieux, dans un premier temps, de regarder la capacité de stockage des lipides au cours de la phase de croissance, puis, d'étudier les altérations potentielles de la reproduction au cours de la maturation artificielle des gonades. Ces analyses nous permettraient de comprendre les processus hormonaux impliqués dans la maturation sexuelle des femelles, et ainsi de mieux apprécier le lien entre nos observations *in vitro* sur les HEPA-E1 et *in situ* sur les *Anguilla marmorata*. Afin de regarder la capacité de stockage des lipides il pourrait aussi être intéressant d'étudier l'activité enzymatique des protéines cytosoliques impliquées dans la lipogenèse et la lipolyse. Pour cela, nous pourrions alors réaliser des études sur des extraits cytosoliques de foie de poissons témoins et exposés aux ETM. Des *A. marmorata* pourraient alors être étudiées en laboratoire dans deux conditions différentes, eau contaminée aux métaux ou non. Plusieurs paramètres pourraient être analysés à la fin de l'expérience tels que l'indice de Fulton, la teneur en lipides dans le foie et dans les muscles, des analyses enzymatiques et génétiques et le dosage des métaux. Les reins, les branchies, le tube digestif, la vésicule biliaire ou encore les cœurs pourraient également être prélevés. L'objectif de ces expérimentations seraient d'apprécier le possible impact de l'exposition au Mn, Co, Cr et Ni sur la mise en réserve de graisses par des anguilles jaunes. Dans un second temps, afin d'étudier l'impact d'une contamination aux métaux sur la reproduction il serait possible de mimer artificiellement la maturation des gonades par des traitements hormonaux à l'aide d'injections répétées d'extraits hypophysaires de carpe (CPE, "Carp Pituitary Extract"), et ainsi suivre le protocole développé par Pierron *et al.*, 2007 à EPOC sur l'anguille européenne (figure 54). Le protocole développé pour appréhender le possible impact des métaux sur la migration de reproduction

de l'anguille se ferait en deux étapes avec une étape durant laquelle les anguilles argentées femelles capturées au début de leur migration, seraient pré-exposées aux métaux. Puis, une étape permettrait de mimer la nage et l'induction de la maturation sexuelle avec des injections intra-péritonéales hebdomadaires de CPE dans une eau de mer naturelle provenant d'un site non contaminé en métaux. À la fin des expérimentations, les anguilles seraient alors toutes disséquées et les organes de la reproduction prélevés, ainsi que les foies, afin de faire des analyses enzymatiques, histologiques, transcriptomiques et de dosage de métaux pour mieux apprécier les impacts potentiels sur la reproduction des *A. marmorata*.

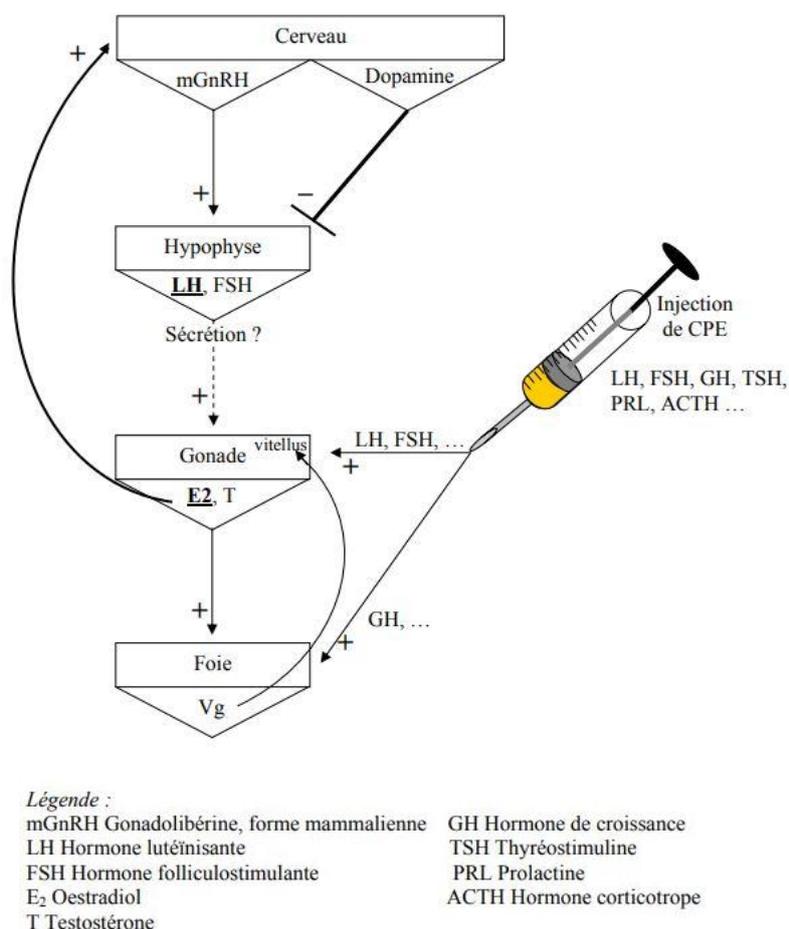


Figure 54 : Schéma du processus mis en évidence lors de la maturation de l'anguille européenne femelle provoqués artificiellement par des injections d'extraits de CPE, d'après Pierron, 2007

Après avoir étudié les impacts des exploitations minières sur des poissons de fin de chaîne alimentaire, il pourrait être intéressant d'étudier d'autres maillons de la chaîne trophique. En

effet, les anguilles se nourrissent par exemple d'*Awaous guamensis*, qui sont des poissons d'eaux douces peu étudiés de nos jours et qui pourraient pourtant être tout autant impactés par la contamination des eaux aux métaux que les anguilles. Nous pourrions, alors, prélever des *Awaous guamensis* dans les mêmes conditions que les anguilles, c'est-à-dire sur les mêmes sites puis réaliser des analyses des métaux Ni, Cr, Co, Mn et Fe sur différentes matrices biologiques afin de quantifier les ETM le long des réseaux trophiques dulçaquicoles et estuariens. Pour aller plus loin nous pourrions ensuite nous intéresser à d'autres maillons de la chaîne en étudiant des modèles biologiques tels que les biofilms périphytiques, eux-mêmes consommés par des poissons brouteurs de biofilms comme les *Awaous guamensis*. Les biofilms périphytiques représentent les premiers maillons trophiques des cours d'eau. Le travail porterait alors sur différentes positions dans le réseau trophique d'eau douce. Ces études viseraient à estimer les niveaux d'exposition des principaux maillons biologiques présents au sein des hydrosystèmes dulçaquicoles calédoniens, afin de caractériser les processus de bioaccumulation, bioconcentration et dispersion des ETM le long de ces réseaux. Sur chaque maillon de la chaîne, des études morphométriques, histologiques, transcriptomiques, mais également protéomiques et de dosage de métaux pourraient ainsi être réalisées afin de qualifier l'état de santé de l'écosystème aquatique néo-calédonien.

REFERENCES

Articles

- ABDAL DAYEM, A., HOSSAIN, M. K., LEE, S. B., KIM, K., SAHA, S. K., YANG, G. M., CHOI, H. Y. & CHO, S. G. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci*, 18.
- AHAMED, M. 2011. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro*, 25, 930-6.
- AHMAD, I., PACHECO, M. & SANTOS, M. A. 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere*, 65, 952-62.
- AHMED, K. A., SAWA, T., IHARA, H., KASAMATSU, S., YOSHITAKE, J., RAHAMAN, M. M., OKAMOTO, T., FUJII, S. & AKAIKE, T. 2012. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem J*, 441, 719-30.
- AIKEN, J. D. & FINKE, R. G. 1999. A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, 145, 1-44.
- AIT-OUFELLA, H., MAURY, E., GUIDET, B. & OFFENSTADT, G. 2008. The endothelium : a new organ. *Reanimation*, 17, 126-136.
- ALI, A. A., MANSOUR, A. B. & ATTIA, S. A. 2021. The potential protective role of apigenin against oxidative damage induced by nickel oxide nanoparticles in liver and kidney of male Wistar rat, *Rattus norvegicus*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28, 27577-27592.
- AMAYA, M. J. & NATHANSON, M. H. 2013. Calcium signaling in the liver. *Compr Physiol*, 3, 515-39.
- AMBATSIAN, P., FERNEX, F., BERNAT, M., PARRON, C. & LECOLLE, J. 1997. High metal inputs to closed seas: The New Caledonian lagoon. *Journal of Geochemical Exploration*, 59, 59-74.
- AMBUDKAR, I. S., DE SOUZA, L. B. & ONG, H. L. 2017. TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. *Cell Calcium*, 63, 33-39.
- ANDERSEN, I. & SVENES, K. B. 1989. Determination of nickel in lung specimens of thirty-nine autopsied nickel workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 61, 289-95.
- ARAI, T., MARUI, M., MILLER, M. J. & TSUKAMOTO, K. 2002. Growth history and inshore migration of the tropical eel, *Anguilla marmorata*, in the Pacific. *Marine Biology*, 140, 309-316.
- ARILLO, A., MARGIOCCO, C., MELODIA, F. & MENSI, P. 1982. Biochemical Effects of Long-Term Exposure to Cr,Cd,Ni on Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri* Rich) - Influence of Sex and Season. *Chemosphere*, 11, 47-57.
- ARRUDA, A. P., PERS, B. M., PARLAKGUL, G., GUNEY, E., INOUE, K. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med*, 20, 1427-35.
- ASHRAF, M. A., MAAH, M. J. & YUSOFF, I. 2011a. Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8, 401-416.
- ASHRAF, M. A., WAJID, A., MAHMOOD, K., MAAH, M. J. & YUSOFF, I. 2011b. Removal of heavy metals from aqueous solution by using mango biomass. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2163-2177.
- ATHIKESAVAN, S., VINCENT, S., AMBROSE, T. & VELMURUGAN, B. 2006. Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). *J Environ Biol*, 27, 391-5.

- BAI, K. J., CHUANG, K. J., CHEN, J. K., HUA, H. E., SHEN, Y. L., LIAO, W. N., LEE, C. H., CHEN, K. Y., LEE, K. Y., HSIAO, T. C., PAN, C. H., HO, K. F. & CHUANG, H. C. 2018. Investigation into the pulmonary inflammopathology of exposure to nickel oxide nanoparticles in mice. *Nanomedicine*, 14, 2329-2339.
- BAILLON, L., PIERRON, F., COUDRET, R., NORMENDEAU, E., CARON, A., PELUHET, L., LABADIE, P., BUDZINSKI, H., DURRIEU, G., SARRACO, J., ELIE, P., COUTURE, P., BAUDRIMONT, M. & BERNATCHEZ, L. 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology*, 24, 71-84.
- BALINT, Z., ZABINI, D., KONYA, V., NAGARAJ, C., VEGH, A. G., VARO, G., WILHELM, I., FAZAKAS, C., KRIZBAI, I. A., HEINEMANN, A., OLSCHESKI, H. & OLSCHESKI, A. 2014. Double-stranded RNA attenuates the barrier function of human pulmonary artery endothelial cells. *PLoS One*, 8, e63776.
- BANSAGHI, S., GOLENAR, T., MADESH, M., CSORDAS, G., RAMACHANDRARAO, S., SHARMA, K., YULE, D. I., JOSEPH, S. K. & HAJNOCZKY, G. 2014. Isoform- and species-specific control of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptors by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 289, 8170-81.
- BARAK, N. A. & MASON, C. F. 1990. Mercury, cadmium and lead in eels and roach: the effects of size, season and locality on metal concentrations in flesh and liver. *Sci Total Environ*, 92, 249-56.
- BEELLEN, R., STAFOGGIA, M., RAASCHOU-NIELSEN, O., ANDERSEN, Z. J., XUN, W. W., KATSOUYANNI, K., DIMAKOPOULOU, K., BRUNEKREEF, B., WEINMAYR, G., HOFFMANN, B., WOLF, K., SAMOLI, E., HOUTHUIJS, D., NIEUWENHUIJSEN, M., OUDIN, A., FORSBERG, B., OLSSON, D., SALOMAA, V., LANKI, T., YLI-TUOMI, T., OFTEDAL, B., AAMODT, G., NAFSTAD, P., DE FAIRE, U., PEDERSEN, N. L., OSTENSON, C. G., FRATIGLIONI, L., PENELL, J., KOREK, M., PYKO, A., ERIKSEN, K. T., TJONNELAND, A., BECKER, T., EEFTENS, M., BOTS, M., MELIEFSTE, K., WANG, M., BUENO-DE-MESQUITA, B., SUGIRI, D., KRAMER, U., HEINRICH, J., DE HOOGH, K., KEY, T., PETERS, A., CYRYS, J., CONCIN, H., NAGEL, G., INEICHEN, A., SCHAFFNER, E., PROBST-HENSCH, N., DRATVA, J., DUCRET-STICH, R., VILIER, A., CLAVEL-CHAPELON, F., STEMPFELET, M., GRIONI, S., KROGH, V., TSAI, M. Y., MARCON, A., RICCI, F., SACERDOTE, C., GALASSI, C., MIGLIORE, E., RANZI, A., CESARONI, G., BADALONI, C., FORASTIERE, F., TAMAYO, I., AMIANO, P., DORRONSORO, M., KATSOULIS, M., TRICHOPOULOU, A., VINEIS, P. & HOEK, G. 2014. Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality: an analysis of 22 European cohorts. *Epidemiology*, 25, 368-78.
- BELL, M. L. & DAVIS, D. L. 2001. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 3, 389-94.
- BENGALLI, R., LONGHIN, E., MARCHETTI, S., PROVERBIO, M. C., BATTAGLIA, C. & CAMATINI, M. 2017. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environ Pollut*, 231, 1314-1321.
- BERMEJO-NOGALES, A., FERNANDEZ, M., FERNANDEZ-CRUZ, M. L. & NAVAS, J. M. 2016. Effects of a silver nanomaterial on cellular organelles and time course of oxidative stress in a fish cell line (PLHC-1). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 190, 54-65.
- BIRGE, W. & BLACK, J. 1980. Aquatic toxicology of nickel. *Nickel in the Environment*, 349-366.
- BKAILY, G., AL-KHOURY, J., SIMON, Y. & JACQUES, D. 2017. Intracellular Free Calcium Measurement Using Confocal Imaging. *Methods Mol Biol*, 1527, 177-187.
- BLANC, M. & GOLDBERG, P. 1985. Cancer des voies respiratoires et travail dans l'extraction et le raffinage du nickel en Nouvelle-Calédonie. *Population*, 40-1, 166-173.

- BLEWETT, T. A. & LEONARD, E. M. 2017. Mechanisms of nickel toxicity to fish and invertebrates in marine and estuarine waters. *Environ Pollut*, 223, 311-322.
- BLOOMFIELD, G. S., VEDANTHAN, R., VASUDEVAN, L., KITHEI, A., WERE, M. & VELAZQUEZ, E. J. 2014. Mobile health for non-communicable diseases in Sub-Saharan Africa: a systematic review of the literature and strategic framework for research. *Global Health*, 10, 49.
- BOETIUS, I. & BOETIUS, J. 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *DANA*, 1.
- BOHM, F. & PERNOW, J. 2007. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 76, 8-18.
- BONGARD, A., AUBERT, J. D. & AEBISCHER, N. 2012. [Pulmonary hypertension: practical approach]. *Rev Med Suisse*, 8, 1150, 1152-3.
- BONHOMMEAU, S., LE PAPE, O., GASCUEL, D., BLANKE, B., TREGUIER, A. M., GRIMA, N., VERMARD, Y., CASTONGUAY, M. & RIVOT, E. 2009. Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model. *J Fish Biol*, 74, 1891-914.
- BONNET, X., BRIAND, M. J., BRISCHOUX, F., LETOURNEUR, Y., FAUVEL, T. & BUSTAMANTE, P. 2014. Anguilliform fish reveal large scale contamination by mine trace elements in the coral reefs of New Caledonia. *Sci Total Environ*, 470-471, 876-82.
- BOSANAC, I., MICHIKAWA, T., MIKOSHIBA, K. & IKURA, M. 2004. Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1742, 89-102.
- BOUCHET, P., JAFFRE, T. & VEILLON, J. M. 1995. Plant Extinction in New-Caledonia - Protection of Sclerophyll Forests Urgently Needed. *Biodiversity and Conservation*, 4, 415-428.
- BOULA, A., LAPORTE-MAGONI, C., GUNKEL-GRILLON, P., BOUR, O. & SELMAOUI-FOLCHER, N. 2022. Potential contamination of stream waters by ultramafic mining sediments: Identification of geochemical markers (New Caledonia). *Journal of Geochemical Exploration*, 232.
- BRAAKHUIS, H. M., CASSEE, F. R., FOKKENS, P. H., DE LA FONTEYNE, L. J., OOMEN, A. G., KRISTEK, P., DE JONG, W. H., VAN LOVEREN, H. & PARK, M. V. 2016. Identification of the appropriate dose metric for pulmonary inflammation of silver nanoparticles in an inhalation toxicity study. *Nanotoxicology*, 10, 63-73.
- BROWN, D. I. & GRIENDLING, K. K. 2015. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*, 116, 531-49.
- BROWN, D. M., STONE, V., FINDLAY, P., MACNEE, W. & DONALDSON, K. 2000. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components. *Occup Environ Med*, 57, 685-91.
- BROWN, J. S., ZEMAN, K. L. & BENNETT, W. D. 2002. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 1240-7.
- BRÜGMANN, L. 1995. Metals in sediments and suspended matter of the river Elbe. *Science of the Total Environment*, 159, 53-65.
- BUHL, K. J. & HAMILTON, S. J. 1991. Relative sensitivity of early life stages of Arctic grayling, Coho salmon, and rainbow trout to nine inorganics. *Ecotoxicol Environ Saf*, 22, 184-97.
- BURY, N. R., WALKER, P. A. & GLOVER, C. N. 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J Exp Biol*, 206, 11-23.
- BURZAWA-GERARD, E., BALOCHE, S., LELOUP-HATEY, J., LE MENN, F., MESSAOURI, H., NUNEZ-RODRIGUEZ, J., PEYON, P. & ROGER, C. 1994. ovogenèse chez l'anguille (*anguilla anguilla* L.) : ultrastructure de l'ovaire a différents stades de développement et implication des lipoprotéines au cours de la vitellogenèse. *Bull Fr Pêche Piscic*, 335, 213-233.

- BUTTERMORE, E. N., COPE, W. G., KWAK, T. J., COONEY, P. B., SHEA, D. & LAZARO, P. R. 2018. Contaminants in tropical island streams and their biota. *Environmental Research*, 161, 615-623.
- CADENAS, E. & DAVIES, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-30.
- CAI, Y., ZHANG, B., KE, W., FENG, B., LIN, H., XIAO, J., ZENG, W., LI, X., TAO, J., YANG, Z., MA, W. & LIU, T. 2016. Associations of Short-Term and Long-Term Exposure to Ambient Air Pollutants With Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hypertension*, 68, 62-70.
- CALMANO, W., HONG, J. & FORSTNER, U. 1993. Binding and Mobilization of Heavy-Metals in Contaminated Sediments Affected by Ph and Redox Potential. *Water Science and Technology*, 28, 223-235.
- CAMPBELL, P. G., ERRECALDE, O., FORTIN, C., HIRIART-BAER, V. P. & VIGNEAULT, B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton--applicability of the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 133, 189-206.
- CAPASSO, L., CAMATINI, M. & GUALTIERI, M. 2014. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett*, 226, 28-34.
- CARLSON, E. & ZELIKOFF, J. 2008. The immune system of fish: a target organ of toxicity. *The toxicology of fishes*, 489-529.
- CASTELLANA, B., ILIEV, D. B., SEPULCRE, M. P., MACKENZIE, S., GOETZ, F. W., MULERO, V. & PLANAS, J. V. 2008. Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Immunol*, 45, 3363-70.
- CHABANET, P., GUILLEMOT, N., KULBICKI, M., VIGLIOLA, L. & SARRAMEGNA, S. 2010. Baseline study of the spatio-temporal patterns of reef fish assemblages prior to a major mining project in New Caledonia (South Pacific). *Mar Pollut Bull*, 61, 598-611.
- CHALUPA, D. C., MORROW, P. E., OBERDORSTER, G., UTELL, M. J. & FRAMPTON, M. W. 2004. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect*, 112, 879-82.
- CHAMBERS, E., ROUNDS, S. & LU, Q. 2018. Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis in Emphysema and Acute Lung Injury. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 228, 63-86.
- CHANG, X., LIU, F., TIAN, M., ZHAO, H., HAN, A. & SUN, Y. 2017a. Nickel oxide nanoparticles induce hepatocyte apoptosis via activating endoplasmic reticulum stress pathways in rats. *Environ Toxicol*, 32, 2492-2499.
- CHANG, X. H., ZHU, A., LIU, F. F., ZOU, L. Y., SU, L., LIU, S. K., ZHOU, H. H., SUN, Y. Y., HAN, A. J., SUN, Y. F., LI, S., LI, J. & SUN, Y. B. 2017b. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF- beta1 activation in rats. *Hum Exp Toxicol*, 36, 802-812.
- CHAOUAT, A., SAVALE, L., CHOUAID, C., TU, L., SZTRYMF, B., CANUET, M., MAITRE, B., HOUSSET, B., BRANDT, C., LE CORVOISIER, P., WEITZENBLUM, E., EDDAHIBI, S. & ADNOT, S. 2009. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest*, 136, 678-687.
- CHAU, Y. & KULIKOVSKY-CORDEIRO, O. 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ Rev*, 3, 95-120.
- CHEN, J., TAN, M., NEMMAR, A., SONG, W., DONG, M., ZHANG, G. & LI, Y. 2006. Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: effect of lipopolysaccharide. *Toxicology*, 222, 195-201.
- CHEN, S. C., CHANG, C. R. & HAN, Y. S. 2018. Seaward Migration Routes of Indigenous Eels, *Anguilla japonica*, *A. marmorata*, and *A. bicolor pacifica*, via Satellite Tags. *Zool Stud*, 57, e21.

- CHEN, X., ZHONG, Z., XU, Z., CHEN, L. & WANG, Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res*, 44, 587-604.
- CHIFFOLEAU, J. F., CHAUVAUD, L., AMOUROUX, D., BARATS, A., DUFOUR, A., PECHEYRAN, C. & ROUX, N. 2004. Nickel and vanadium contamination of benthic invertebrates following the "Erika" wreck. *Aquatic Living Resources*, 17, 273-280.
- CHISTIYAKOV, D. A., SHKURAT, T. P., MELNICHENKO, A. A., GRECHKO, A. V. & OREKHOV, A. N. 2018. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med*, 50, 121-127.
- CHOWDHURY, M. J., BUCKING, C. & WOOD, C. M. 2008a. Is nickel an essential metal for aquatic animals? *Integr Environ Assess Manag*, 4, 266-7.
- CHOWDHURY, M. J., BUCKING, C. & WOOD, C. M. 2008b. Pre-exposure to waterborne nickel downregulates gastrointestinal nickel uptake in rainbow trout: indirect evidence for nickel essentiality. *Environ Sci Technol*, 42, 1359-64.
- CONNELL, D. W. & MARKWELL, R. D. 1990. Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere*, 20, 91-100.
- CONNELL, D. W., WU, R. S. S., RICHARDSON, B. J., LEUNG, K., LAM, P. S. K. & CONNELL, P. A. 1998. Occurrence of persistent organic contaminants and related substances in Hong Kong marine areas: an overview. *Marine Pollution Bulletin*, 36, 376-384.
- COPPE, A., PUJOLAR, J. M., MAES, G. E., LARSEN, P. F., HANSEN, M. M., BERNATCHEZ, L., ZANE, L. & BORTOLUZZI, S. 2010. Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EeelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered European eel. *BMC Genomics*, 11, 635.
- CORTIJO, J., MILARA, J., MATA, M., DONET, E., GAVARA, N., PEEL, S. E., HALL, I. P. & MORCILLO, E. J. 2010. Nickel induces intracellular calcium mobilization and pathophysiological responses in human cultured airway epithelial cells. *Chem Biol Interact*, 183, 25-33.
- COURTOIS, A., ANDUJAR, P., LADEIRO, Y., DUCRET, T., ROGERIEUX, F., LACROIX, G., BAUDRIMONT, I., GUIBERT, C., ROUX, E., CANAL-RAFFIN, M., BROCHARD, P., MARANO, F., MARTHAN, R. & MULLER, B. 2010. Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245, 203-10.
- COUTURE, P., BUSBY, P., GAUTHIER, C., RAJOTTE, J. W. & PYLE, G. G. 2008. Seasonal and regional variations of metal contamination and condition indicators in yellow perch (*Perca flavescens*) along two polymetallic gradients. I. Factors influencing tissue metal concentrations. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14, 97-125.
- CUSSAC, L. A., CARDOUAT, G., TIRUCHELLVAM PILLAI, N., CAMPAGNAC, M., ROBILLARD, P., MONTILLAUD, A., GUIBERT, C., GAILLY, P., MARTHAN, R., QUIGNARD, J. F., SAVINEAU, J. P. & DUCRET, T. 2020. TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 318, L135-L146.
- DAVIES, P. F. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 75, 519-60.
- DEGHANI, A., AMINJAN, A. R. & DEGHANI, A. 2022. Trophic transfer, bioaccumulation, and health risk assessment of heavy metals in Aras River: case study-Amphipoda- zander - human. *Environmental Science and Pollution Research*.
- DELEEBECK, N. M., DE SCHAMPHELAERE, K. A., HEIJERICK, D. G., BOSSUYT, B. T. & JANSSEN, C. R. 2008. The acute toxicity of nickel to *Daphnia magna*: predictive capacity of bioavailability models in artificial and natural waters. *Ecotoxicol Environ Saf*, 70, 67-78.
- DELEEBECK, N. M., DE SCHAMPHELAERE, K. A. & JANSSEN, C. R. 2007. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. *Ecotoxicol Environ Saf*, 67, 1-13.

- DERBYSHIRE, E. 2007. Natural minerogenic dust and human health. *Ambio*, 36, 73-7.
- DESCHACHT, M., HOREMANS, T., MARTINET, W., BULT, H., MAES, L. & COS, P. 2010. Comparative EPR study of different macrophage types stimulated for superoxide and nitric oxide production. *Free Radic Res*, 44, 763-72.
- DEWEIRDT, J., DUCRET, T., QUIGNARD, J. F., FREUND-MICHEL, V., LACOMME, S., GONTIER, E., MULLER, B., MARTHAN, R., GUIBERT, C. & BAUDRIMONT, I. 2021. Effects of FW2 Nanoparticles Toxicity in a New In Vitro Pulmonary Vascular Cells Model Mimicking Endothelial Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol*.
- DEWEIRDT, J., QUIGNARD, J. F., CROBEDDU, B., BAEZA-SQUIBAN, A., SCIARE, J., COURTOIS, A., LACOMME, S., GONTIER, E., MULLER, B., SAVINEAU, J. P., MARTHAN, R., GUIBERT, C. & BAUDRIMONT, I. 2017. Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol In Vitro*, 45, 340-350.
- DEWEIRDT, J., QUIGNARD, J. F., LACOMME, S., GONTIER, E., MORNET, S., SAVINEAU, J. P., MARTHAN, R., GUIBERT, C. & BAUDRIMONT, I. 2020. In vitro study of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: effects on calcium signaling and mitochondrial alterations. *Arch Toxicol*, 94, 2331-2348.
- DI BUCCHIANICO, S., GLIGA, A. R., AKERLUND, E., SKOGLUND, S., WALLINDER, I. O., FADEEL, B. & KARLSSON, H. L. 2018. Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Part Fibre Toxicol*, 15, 32.
- DIAS, R. G., NEGRAO, C. E. & KRIEGER, M. H. 2011. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arq Bras Cardiol*, 96, 68-75.
- DU, J., TANG, J. H., XU, S. D., GE, J. Y., DONG, Y. W., LI, H. X. & JIN, M. Q. 2018. A review on silver nanoparticles-induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 231-239.
- DUAN, W. X., HE, M. D., MAO, L., QIAN, F. H., LI, Y. M., PI, H. F., LIU, C., CHEN, C. H., LU, Y. H., CAO, Z. W., ZHANG, L., YU, Z. P. & ZHOU, Z. 2015. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 286, 80-91.
- DUCRET, T., EL ARROUCHI, J., COURTOIS, A., QUIGNARD, J. F., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J. P. 2010. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium*, 48, 251-9.
- DUMALA, N., MANGALAMPALLI, B., KALYAN KAMAL, S. S. & GROVER, P. 2018. Biochemical alterations induced by nickel oxide nanoparticles in female Wistar albino rats after acute oral exposure. *Biomarkers*, 23, 33-43.
- E. BURZAWA-GERARD, S. B., J. LELOUP-HATEY, F. LE MENN, H. MESSAOURI, J. NUNEZ-RODRIGUEZ, P. PEYON ET C. ROGER 2008. Oogenesis in the eel (*Angilla anguilla* L.) : oocyte ultrastructure at different stages of development and role played by lipoproteins during vitellogenesis. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 335, 213 - 233.
- EGE, G. N. & CLARK, R. M. 1985. Internal mammary lymphoscintigraphy in the conservative management of breast carcinoma: an update and recommendations for a new TNM staging. *Clin Radiol*, 36, 469-72.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ERICKSON, R. J., BENOIT, D. A., MATTSON, V. R., NELSON, H. P. & LEONARD, E. N. 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 181-193.
- EVANS, D. H., PIERMARINI, P. M. & CHOE, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev*, 85, 97-177.

- FABBRI, E., BARBIN, L., CAPUZZO, A. & BIONDI, C. 1998. Adenylyl cyclase activity and glucose release from the liver of the European eel, *Anguilla anguilla*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1563-R1570.
- FENG-YU, W., WEN-CHU, F., I-LI, W., HONG, Y. & TZI-YUAN, W. 2014. The Giant Mottled Eel, *Anguilla marmorata*, Uses BlueShifted Rod Photoreceptors during Upstream Migration. *PLoS One*, 9.
- FINK, S. L. & COOKSON, B. T. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73, 1907-16.
- FOLEY, S., CROWLEY, C., SMAIHI, M., BONFILS, C., ERLANGER, B. F., SETA, P. & LARROQUE, C. 2002. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 116-9.
- FREUND-MICHEL, V., GUIBERT, C., DUBOIS, M., COURTOIS, A., MARTHAN, R., SAVINEAU, J. P. & MULLER, B. 2013. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther Adv Respir Dis*, 7, 175-200.
- FREUND-MICHEL, V., KHOYRATTEE, N., SAVINEAU, J. P., MULLER, B. & GUIBERT, C. 2014. Mitochondria: roles in pulmonary hypertension. *Int J Biochem Cell Biol*, 55, 93-7.
- FROESE, R. & PAULY, D. 2004. FishBase.
- GALIE, N., CORRIS, P. A., FROST, A., GIRGIS, R. E., GRANTON, J., JING, Z. C., KLEPETKO, W., MCGOON, M. D., MCLAUGHLIN, V. V., PRESTON, I. R., RUBIN, L. J., SANDOVAL, J., SEEGER, W. & KEOGH, A. 2013. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62, D60-72.
- GALIE, N., HUMBERT, M., VACHIERY, J. L., GIBBS, S., LANG, I., TORBICKI, A., SIMONNEAU, G., PEACOCK, A., VONK NOORDEGRAAF, A., BEGHETTI, M., GHOFRANI, A., GOMEZ SANCHEZ, M. A., HANSMANN, G., KLEPETKO, W., LANCELLOTTI, P., MATUCCI, M., MCDONAGH, T., PIERARD, L. A., TRINDADE, P. T., ZOMPATORI, M. & HOEPER, M. 2015. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*, 46, 903-75.
- GARCEAU, N., PICHAUD, N. & COUTURE, P. 2010. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquatic Toxicology*, 98, 107-112.
- GAUTHIER, C., CAMPBELL, P. G. C. & COUTURE, P. 2009. Condition and pyloric caeca as indicators of food web effects in fish living in metal-contaminated lakes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 2066-2074.
- GEERAERTS, C. & BELPAIRE, C. 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*, 19, 239-66.
- GERMANDE, O., BAUDRIMONT, M., BEAUFILS, F., FREUND-MICHEL, V., DUCRET, T., QUIGNARD, J. F., ERRERA, M. H., LACOMME, S., GONTIER, E., MORNET, S., BEJKO, M., MULLER, B., MARTHAN, R., GUIBERT, C., DEWEIRDT, J. & BAUDRIMONT, I. 2022. NiONPs-induced alteration in calcium signaling and mitochondrial function in pulmonary artery endothelial cells involves oxidative stress and TRPV4 channels disruption. *Nanotoxicology*, 1-23.
- GIAID, A., YANAGISAWA, M., LANGLEBEN, D., MICHEL, R. P., LEVY, R., SHENNIB, H., KIMURA, S., MASAKI, T., DUGUID, W. P. & STEWART, D. J. 1993. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 328, 1732-9.
- GLIGA, A. R., SKOGLUND, S., WALLINDER, I. O., FADEEL, B. & KARLSSON, H. L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11.

- GLOVER, C. N., SHARMA, S. K. & WOOD, C. M. 2005. Heterogeneity in physicochemical properties explains differences in silver toxicity amelioration by natural organic matter to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2941-2947.
- GONY, S. 1990. Short Note on the Effects of Cadmium on the Gill of the Glass Eel (*Anguilla-Anguilla*). *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, 75, 835-836.
- GONZALEZ, P., BAUDRIMONT, M., BOUDOU, A. & BOURDINEAUD, J. P. 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals*, 19, 225-35.
- GORDEEVA, A. V., ZVYAGILSKAYA, R. A. & LABAS, Y. A. 2003. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)*, 68, 1077-80.
- GÖRLACH, A., BERTRAM, K., HUDECOVA, S. & KRIZANOVA, O. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol*, 6, 260-271.
- GUIBERT, C., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J. P. 2004. 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, L1228-36.
- GUIBERT, C., MARTHAN, R. & SAVINEAU, J. P. 2007. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Curr Pharm Des*, 13, 2443-55.
- GUNKEL-GRILLON, P., LAPORTE-MAGONI, C., LEMESTRE, M. & BAZIRE, N. 2014. Toxic chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 511-516.
- HAJNOCZKY, G., ROBB-GASPERS, L. D., SEITZ, M. B. & THOMAS, A. P. 1995. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, 82, 415-24.
- HAO, L., WANG, Z. & XING, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci (China)*, 21, 1459-66.
- HARMON, J. S., RIENIETS, L. M. & SHERIDAN, M. A. 1993. Glucagon and insulin regulate lipolysis in trout liver by altering phosphorylation of triacylglycerol lipase. *Am J Physiol*, 265, R255-60.
- HE, Z. L., YANG, X. E. & STOFFELLA, P. J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol*, 19, 125-40.
- HEDOUIN, L., PRINGAULT, O., METIAN, M., BUSTAMANTE, P. & WARNAU, M. 2007. Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: seawater and food exposure. *Chemosphere*, 66, 1449-57.
- HENDERSON, R. J. & SARGENT, J. R. 1981. Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol*, 69C, 31-7.
- HERVE, P., LAUNAY, J. M., SCROBOHACI, M. L., BRENOT, F., SIMONNEAU, G., PETITPRETZ, P., POUBEAU, P., CERRINA, J., DUROUX, P. & DROUET, L. 1995. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*, 99, 249-54.
- HOEPER, M. M., GHOFRANI, H. A., GRUNIG, E., KLOSE, H., OLSCHESKI, H. & ROSENKRANZ, S. 2017. Pulmonary Hypertension. *Dtsch Arztebl Int*, 114, 73-84.
- HOEPER, M. M., HUMBERT, M., SOUZA, R., IDREES, M., KAWUT, S. M., SLIWA-HAHNLE, K., JING, Z. C. & GIBBS, J. S. 2016. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*, 4, 306-22.
- HOREMANS, B., VAN HOLSBEKE, C., VOS, W., DARCHUK, L., NOVAKOVIC, V., FONTAN, A. C., DE BACKER, J., VAN GRIEKEN, R., DE BACKER, W. & DE WAEL, K. 2012. Particle deposition in airways of chronic respiratory patients exposed to an urban aerosol. *Environ Sci Technol*, 46, 12162-9.
- HORIE, M., FUKUI, H., NISHIO, K., ENDOH, S., KATO, H., FUJITA, K., MIYAUCHI, A., NAKAMURA, A., SHICHIRI, M., ISHIDA, N., KINUGASA, S., MORIMOTO, Y., NIKI, E., YOSHIDA, Y. &

- IWAHASHI, H. 2011. Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. *J Occup Health*, 53, 64-74.
- HOROWITZ, A. J. 2000. NASQAN*: the design and implementation of a large-river suspended sediment and trace element flux programme. *Role of Erosion and Sediment Transport in Nutrient and Contaminant Transfer, Proceedings*, 3-18.
- IQBAL, S., JABEEN, F., PENG, C., SHAH, M. A., IJAZ, M. U., RASUL, A., ALI, S., RAUF, A., BATIHA, G. E. & KLODZINSKA, E. 2021. Nickel nanoparticles induce hepatotoxicity via oxidative and nitrate stress-mediated apoptosis and inflammation. *Toxicol Ind Health*, 37, 619-634.
- ISNARD, S., L'HUILLIER, L., RIGAULT, F. & JAFFRÉ, T. 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant and Soil*, 403, 53-76.
- IVASK, A., TITMA, T., VISNAPUU, M., VIJA, H., KAKINEN, A., SIHTMAE, M., POKHREL, S., MADLER, L., HEINLAAN, M., KISAND, V., SHIMMO, R. & KAHRU, A. 2015. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr Top Med Chem*, 15, 1914-29.
- IZIKKI, M., GUIGNABERT, C., FADEL, E., HUMBERT, M., TU, L., ZADIGUE, P., DARTEVELLE, P., SIMONNEAU, G., ADNOT, S., MAITRE, B., RAFFESTIN, B. & EDDAHIBI, S. 2009. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest*, 119, 512-23.
- JAVED, M. & USMANI, N. 2013. Assessment of heavy metal (Cu, Ni, Fe, Co, Mn, Cr, Zn) pollution in effluent dominated rivulet water and their effect on glycogen metabolism and histology of *Mastacembelus armatus*. *Springerplus*, 2.
- KANEKO, F. T., ARROLIGA, A. C., DWEIK, R. A., COMHAIR, S. A., LASKOWSKI, D., OPPEDISANO, R., THOMASSEN, M. J. & ERZURUM, S. C. 1998. Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 158, 917-23.
- KAROLY, E. D., LI, Z., DAILEY, L. A., HYSENI, X. & HUANG, Y. C. 2007. Up-regulation of tissue factor in human pulmonary artery endothelial cells after ultrafine particle exposure. *Environ Health Perspect*, 115, 535-40.
- KASPRZAK, K. S. 1987. Nickel. *Adv Mod Environ Toxicol*, 11, 145-183.
- KASPRZAK, K. S. & POIRIER, L. A. 1985. Effects of calcium(II) and magnesium(II) on nickel(II) uptake and stimulation of thymidine incorporation into DNA in the lungs of strain A mice. *Carcinogenesis*, 6, 1819-21.
- KETTLE, C. J., HOLLINGSWORTH, P. M., JAFFRE, T., MORAN, B. & ENNOS, R. A. 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Mol Ecol*, 16, 3581-91.
- KONG, L., TANG, M., ZHANG, T., WANG, D., HU, K., LU, W., WEI, C., LIANG, G. & PU, Y. 2014. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *Int J Mol Sci*, 15, 21253-69.
- KONIK, E. A., HAN, Y. S. & BROZOVICH, F. V. 2013. The role of pulmonary vascular contractile protein expression in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*, 65, 147-55.
- KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., APPEL, L. J. & AMERICAN HEART ASSOCIATION. NUTRITION, C. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106, 2747-57.
- KRISHNAN, R. M., ADAR, S. D., SZPIRO, A. A., JORGENSEN, N. W., VAN HEE, V. C., BARR, R. G., O'NEILL, M. S., HERRINGTON, D. M., POLAK, J. F. & KAUFMAN, J. D. 2012. Vascular responses to long- and short-term exposure to fine particulate matter: MESA Air (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution). *J Am Coll Cardiol*, 60, 2158-66.

- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KROGER, E. & LAFORCE, R., JR. 2016. Fish Consumption, Brain Mercury, and Neuropathology in Patients With Alzheimer Disease and Dementia. *JAMA*, 315, 465-6.
- KUNJIAPPAN, S., BHATTACHARJEE, C. & CHOWDHURY, R. 2015. In vitro antioxidant and hepatoprotective potential of *Azolla microphylla* phytochemically synthesized gold nanoparticles on acetaminophen - induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio* L. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51, 630-43.
- KUROKI, M., AOYAMA, J., MILLER, M. J., WOUTHUYZEN, S., ARAI, T. & TSUKAMOTO, K. 2006. Contrasting patterns of growth and migration of tropical anguillid leptocephali in the western Pacific and Indonesian Seas. *Marine Ecology Progress Series*, 309, 233-246.
- KUROKI, M., AOYAMA, J., MILLER, M. J., YOSHINAGA, T., SHINODA, A., HAGIHARA, S. & TSUKAMOTO, K. 2009. Sympatric spawning of *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica* in the western North Pacific Ocean. *J Fish Biol*, 74, 1853-65.
- KWON, H. C. & MUGIYA, Y. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen Comp Endocrinol*, 93, 51-60.
- L'HUILLIER, L. J. T. W. A. L. M. M. L. B. N. C. J. J. H. A. H., DUCOUSSO M ; GÂTEBLÉ G ; FOGLIANI B ; ZONGO C AND VEA C 2010. Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. *Etudes et Synthèses*, 412.
- LADOR, F., BEGHETTI, M. & ROCHAT, T. 2009. [Early detection and treatment of pulmonary arterial hypertension]. *Rev Med Suisse*, 5, 2317-21.
- LAI, N., LU, W. & WANG, J. 2015. Ca²⁺ and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 1081-92.
- LAM, A. K. & GALIONE, A. 2013. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2542-59.
- LANGSTON, W. J., CHESMAN, B. S., BURT, G. R., POPE, N. D. & MCEVOY, J. 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Mar Environ Res*, 53, 263-93.
- LARSSON, P., HAMRIN, S. & OKLA, L. 1990. Fat content as a factor inducing migratory behaviour in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften*, 77, 488-490.
- LASKEY, R. E., ADAMS, D. J., CANNELL, M. & VAN BREEMEN, C. 1992. Calcium entry-dependent oscillations of cytoplasmic calcium concentration in cultured endothelial cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 1690-4.
- LASSEGUE, B., SAN MARTIN, A. & GRIENDLING, K. K. 2012. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*, 110, 1364-90.
- LATVALA, S., HEDBERG, J., DI BUCCHIANICO, S., MOLLER, L., ODNEVALL WALLINDER, I., ELIHN, K. & KARLSSON, H. L. 2016. Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles. *PLoS One*, 11, e0159684.
- LE CROIZIER, G., SCHAAL, G., GALLON, R., FALL, M., LE GRAND, F., MUNARON, J. M., ROUGET, M. L., MACHU, E., LE LOC'H, F., LAE, R. & DE MORAIS, L. T. 2016. Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. *Sci Total Environ*, 573, 83-95.
- LEE, J. H., GOMORA, J. C., CRIBBS, L. L. & PEREZ-REYES, E. 1999. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J*, 77, 3034-42.
- LEE, S., HWANG, S. H., JEONG, J., HAN, Y., KIM, S. H., LEE, D. K., LEE, H. S., CHUNG, S. T., JEONG, J., ROH, C., HUH, Y. S. & CHO, W. S. 2016. Nickel oxide nanoparticles can recruit

- eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin. *Part Fibre Toxicol*, 13, 30.
- LEONARD, E. M., NADELLA, S. R., BUCKING, C. & WOOD, C. M. 2009. Characterization of dietary Ni uptake in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol*, 93, 205-16.
- LEVIN, E. R. 1995. Endothelins. *N Engl J Med*, 333, 356-63.
- LI, M., XIA, T., JIANG, C. S., LI, L. J., FU, J. L. & ZHOU, Z. C. 2003. Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis. *Toxicology*, 194, 19-33.
- LIBERDA, E. N., CUEVAS, A. K., GILLESPIE, P. A., GRUNIG, G., QU, Q. & CHEN, L. C. 2010. Exposure to inhaled nickel nanoparticles causes a reduction in number and function of bone marrow endothelial progenitor cells. *Inhal Toxicol*, 22 Suppl 2, 95-9.
- LIN, H., ROMSOS, D. R., TACK, P. I. & LEVEILLE, G. A. 1977. Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J Nutr*, 107, 846-54.
- LINDE, A. R., SANCHEZ-GALAN, S., VALLES-MOTA, P. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol Environ Saf*, 49, 60-3.
- LIONETTO, M. G., MAFFIA, M., CAPPELLO, M. S., GIORDANO, M. E., STORELLI, C. & SCHETTINO, T. 1998. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺-K⁺-ATPase in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, 120, 89-91.
- LIU, L., ZHOU, Q., LIN, C., HE, L. & WEI, L. 2021. Histological alterations, oxidative stress, and inflammatory response in the liver of swamp eel (*Monopterus albus*) acutely exposed to copper. *Fish Physiol Biochem*, 47, 1865-1878.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOGAN, W. P. 1953. Mortality in the London fog incident, 1952. *Lancet*, 1, 336-8.
- LOSFELD, G., L'HUILLIER, L., FOGLIANI, B., JAFFRE, T. & GRISON, C. 2015. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, 5592-607.
- LYTTON, J., WESTLIN, M. & HANLEY, M. R. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266, 17067-71.
- MA, L., ROMAN-CAMPOS, D., AUSTIN, E. D., EYRIES, M., SAMPSON, K. S., SOUBRIER, F., GERMAIN, M., TREGOUET, D. A., BORCZUK, A., ROSENZWEIG, E. B., GIRERD, B., MONTANI, D., HUMBERT, M., LOYD, J. E., KASS, R. S. & CHUNG, W. K. 2013a. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 369, 351-361.
- MA, X., DU, J., ZHANG, P., DENG, J., LIU, J., LAM, F. F., LI, R. A., HUANG, Y., JIN, J. & YAO, X. 2013b. Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension*, 62, 134-9.
- MADREITER-SOKOLOWSKI, C. T., THOMAS, C. & RISTOW, M. 2020. Interrelation between ROS and Ca(2+) in aging and age-related diseases. *Redox Biol*, 36, 101678.
- MAJUMDAR, S., PERALTA-VIDEA, J. R., TRUJILLO-REYES, J., SUN, Y., BARRIOS, A. C., NIU, G., MARGEZ, J. P. F. & GARDEA-TORRESDEY, J. L. 2016a. Soil organic matter influences cerium translocation and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. *Sci Total Environ*, 569-570, 201-211.
- MAJUMDAR, S., TRUJILLO-REYES, J., HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A., WHITE, J. C., PERALTA-VIDEA, J. R. & GARDEA-TORRESDEY, J. L. 2016b. Cerium Biomagnification in a Terrestrial Food Chain: Influence of Particle Size and Growth Stage. *Environ Sci Technol*, 50, 6782-92.

- MALEK, A. M. & IZUMO, S. 1995. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biomech*, 28, 1515-28.
- MALHI, H. & KAUFMAN, R. J. 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*, 54, 795-809.
- MANIATIS, N. A., BROVKOVYCH, V., ALLEN, S. E., JOHN, T. A., SHAJAHAN, A. N., TIRUPPATHI, C., VOGEL, S. M., SKIDGEL, R. A., MALIK, A. B. & MINSHALL, R. D. 2006. Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ Res*, 99, 870-7.
- MARANO, F., HUSSAIN, S., RODRIGUES-LIMA, F., BAEZA-SQUIBAN, A. & BOLAND, S. 2011. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*, 85, 733-41.
- MARSHALL, W. 2006. Osmosensing mechanisms of ion transporting epithelial systems. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 143, S43-S44.
- MASSARSKY, A., ABRAHAM, R., NGUYEN, K. C., RIPPSTEIN, P., TAYABALI, A. F., TRUDEAU, V. L. & MOON, T. W. 2014. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes (vol 159, pg 10, 2014). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 162, 15-15.
- MATES, J. M. & SANCHEZ-JIMENEZ, F. M. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 157-70.
- MCCORMACK, M. C. & MATHAI, S. C. 2019. A crossroads between the heart and lungs: air pollution and pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 53.
- MESSINA, A., REINA, S., GUARINO, F. & DE PINTO, V. 2012. VDAC isoforms in mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 1466-76.
- MIGON, C., OUIILLON, S., MARI, X. & NICOLAS, E. 2007. Geochemical and hydrodynamic constraints on the distribution of trace metal concentrations in the lagoon of Noumea, New Caledonia. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 74, 756-765.
- MILLER, K. A., SPALT, E. W., GASSETT, A. J., CURL, C. L., LARSON, T. V., AVOL, E., ALLEN, R. W., VEDAL, S., SZPIRO, A. A. & KAUFMAN, J. D. 2018. Estimating ambient-origin PM_{2.5} exposure for epidemiology: observations, prediction, and validation using personal sampling in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Expo Sci Environ Epidemiol*.
- MILLER, M. J., MOCHIOKA, N., OTAKE, T. & TSUKAMOTO, K. 2002. Evidence of a spawning area of *Anguilla marmorata* in the western North Pacific. *Marine Biology*, 140, 809-814.
- MILLER, M. R., RAFTIS, J. B., LANGRISH, J. P., MCLEAN, S. G., SAMUTRTAI, P., CONNELL, S. P., WILSON, S., VESEY, A. T., FOKKENS, P. H. B., BOERE, A. J. F., KRISTEK, P., CAMPBELL, C. J., HADDOKE, P. W. F., DONALDSON, K., CASSEE, F. R., NEWBY, D. E., DUFFIN, R. & MILLS, N. L. 2017. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano*, 11, 4542-4552.
- MILLS, N. L., DONALDSON, K., HADDOKE, P. W., BOON, N. A., MACNEE, W., CASSEE, F. R., SANDSTROM, T., BLOMBERG, A. & NEWBY, D. E. 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6, 36-44.
- MO, Y., JIANG, M., ZHANG, Y., WAN, R., LI, J., ZHONG, C. J., LI, H., TANG, S. & ZHANG, Q. 2019. Comparative mouse lung injury by nickel nanoparticles with differential surface modification. *J Nanobiotechnology*, 17, 2.
- MOHAMED, K., ZINE, K., FAHIMA, K., ABDELFATTAH, E., SHARIFUDIN, S. M. & DUDUKU, K. 2018. NiO nanoparticles induce cytotoxicity mediated through ROS generation and impairing the antioxidant defense in the human lung epithelial cells (A549): Preventive effect of Pistacia lentiscus essential oil. *Toxicol Rep*, 5, 480-488.
- MONTANI, D., GUNTHER, S., DORFMULLER, P., PERROS, F., GIRERD, B., GARCIA, G., JAIS, X., SAVALE, L., ARTAUD-MACARI, E., PRICE, L. C., HUMBERT, M., SIMONNEAU, G. & SITBON, O. 2013. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*, 8, 97.

- MORIARTY, C. & DEKKER, W. 1997. Management of the European eel fisheries. *Fish Bull*, 15, 109.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MUNOZ, A. & COSTA, M. 2012. Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: a review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 260, 1-16.
- NAIK, J. S. & WALKER, B. R. 2018. Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels. *Pflugers Arch*, 470, 633-648.
- NEALL, V. E. & TREWICK, S. A. 2008. The age and origin of the Pacific islands: a geological overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, 3293-308.
- NEBEKER, A. V., SAVONEN, C. & STEVENS, D. G. 1985. Sensitivity of Rainbow-Trout Early Life Stages to Nickel Chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4, 233-239.
- NEL, A., XIA, T., MADLER, L. & LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 622-7.
- NELSON, A. & DONKIN, P. 1985. Processes of Bioaccumulation - the Importance of Chemical Speciation. *Marine Pollution Bulletin*, 16, 164-169.
- NEMMAR, A., AL-SALAM, S., BEEGAM, S., YUVARAJU, P. & ALI, B. H. 2017. The acute pulmonary and thrombotic effects of cerium oxide nanoparticles after intratracheal instillation in mice. *Int J Nanomedicine*, 12, 2913-2922.
- NEMMAR, A., HOET, P. H., VANQUICKENBORNE, B., DINSDALE, D., THOMEER, M., HOYLAERTS, M. F., VANBILLOEN, H., MORTELMANS, L. & NEMERY, B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*, 105, 411-4.
- NEMMAR, A., HOLME, J. A., ROSAS, I., SCHWARZE, P. E. & ALFARO-MORENO, E. 2013. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *Biomed Res Int*, 2013, 279371.
- NEMMAR, A., VANBILLOEN, H., HOYLAERTS, M. F., HOET, P. H., VERBRUGGEN, A. & NEMERY, B. 2001. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 1665-8.
- NEWMAN, M. C., JAGOE, C. H., HEAMELINK, P., LANDRUM, H. L. & BENSON, W. 1994. Bioavailability: physical, chemical and biological interactions. *Lewis Publishers*.
- NIELSEN, F. H. 2000. Importance of making dietary recommendations for elements designated as nutritionally beneficial, pharmacologically beneficial, or conditionally essential. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 13, 113-129.
- NIYOGI, S. & WOOD, C. M. 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ Sci Technol*, 38, 6177-92.
- NORSETH, T. 1994. Environmental pollution around nickel smelters in the Kola Peninsula (Russia). *Sci Total Environ*, 148, 103-8.
- NOURI, J., KARBASSI, A. R. & MIRKIA, S. 2008a. Environmental management of coastal regions in the Caspian Sea. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 5, 43-52.
- NOURI, J., MAHVI, A. H., JAHED, G. R. & BABAEI, A. A. 2008b. Regional distribution pattern of groundwater heavy metals resulting from agricultural activities. *Environmental Geology*, 55, 1337-1343.
- NUNES, B., CAPELA, R. C., SERGIO, T., CALDEIRA, C., GONCALVES, F. & CORREIA, A. T. 2014. Effects of chronic exposure to lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21, 5689-700.
- OBERDORSTER, G., FERIN, J. & LEHNERT, B. E. 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 5, 173-9.

- OJO, A. A. & WOOD, C. M. 2007. In vitro analysis of the bioavailability of six metals via the gastro-intestinal tract of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 83, 10-23.
- OLIVEIRA, M., SERAFIM, A., BEBIANNO, M. J., PACHECO, M. & SANTOS, M. A. 2008. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*, 70, 20-6.
- ORRENIUS, S., ZHIVOTOVSKY, B. & NICOTERA, P. 2003. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 552.
- OSTASZEWSKA, T., SLIWINSKI, J., KAMASZEWSKI, M., SYSA, P. & CHOJNACKI, M. 2018. Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25, 908-915.
- PACHER, P. & SZABO, C. 2006. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol*, 6, 136-41.
- PANE, E. F., BUCKING, C., PATEL, M. & WOOD, C. M. 2005. Renal function in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following acute and prolonged exposure to waterborne nickel. *Aquat Toxicol*, 72, 119-33.
- PANE, E. F., GLOVER, C. N., PATEL, M. & WOOD, C. M. 2006a. Characterization of Ni transport into brush border membrane vesicles (BBMVs) isolated from the kidney of the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta*, 1758, 74-84.
- PANE, E. F., MCDONALD, M. D., CURRY, H. N., BLANCHARD, J., WOOD, C. M. & GROSELL, M. 2006b. Hydromineral balance in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) exposed to waterborne or infused nickel. *Aquat Toxicol*, 80, 70-81.
- PANKHURST, N. W. 1982. Changes in body musculature with sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology*, 21, 417-428.
- PARPAITE, T., CARDOUAT, G., MAUROUX, M., GILLIBERT-DUPLANTIER, J., ROBILLARD, P., QUIGNARD, J. F., MARTHAN, R., SAVINEAU, J. P. & DUCRET, T. 2016. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 468, 111-130.
- PASQUET, C., GUNKEL-GRILLON, P., LAPORTE-MAGONI, C., SERRES, A., QUINIOU, T., ROCCA, F., MONNA, F., LOSNO, R., VAN OORT, F. & CHATEAU, C. 2016a. Alternative dry separation of PM10 from soils for characterization by kinetic extraction: example of new Caledonian mining soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 25105-25113.
- PASQUET, C., MONNA, F., VAN OORT, F., GUNKEL-GRILLON, P., LAPORTE-MAGONI, C., LOSNO, R. & CHATEAU, C. 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ Monit Assess*, 190, 638.
- PATERGNANI, S., SUSKI, J. M., AGNOLETTI, C., BONONI, A., BONORA, M., DE MARCHI, E., GIORGI, C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., POLETTI, F., RIMESSI, A., DUSZYNSKI, J., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2011. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal*, 9, 19.
- PEDERSEN, S. F. & NILIUS, B. 2007. Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation. *Methods Enzymol*, 428, 183-207.
- PELLETIER, B. 2007. Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity. *Compendium of marine species from New Caledonia*, ISSN 1297-9635. Seconde édition.
- PEMPKOWIAK, J., KOZUCH, J., GRZEGOWSKA, H. & GJESSING, E. T. 1999. Biological vs. chemical properties of natural organic matter isolated from selected Norwegian lakes. *Environment International*, 25, 357-366.
- PERRIER, F., BERTUCCI, A., PIERRON, F., FEURTET-MAZEL, A., SIMON, O., KLOPP, C., CANDAUDAP, F., POKROVSKI, O., ETCHEVERRIA, B., MORNET, S. & BAUDRIMONT, M.

2020. Transfer and Transcriptomic Profiling in Liver and Brain of European Eels (*Anguilla anguilla*) After Diet-borne Exposure to Gold Nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 39, 2450-2461.
- PHIPPS, T., TANK, S., WIRTZ, J., BREWER, L., COYNER, A., ORTEHP, L. S. & FAIRBROTHER, A. 2002. Essentiality of nickel and homeostatic mechanisms for its regulation in terrestrial organisms. *Environ Rev*, 10, 209-261.
- PIERRON, F., BAUDRIMONT, M., BOSSY, A., BOURDINEAUD, J. P., BRETHER, D., ELIE, P. & MASSABUAU, J. C. 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology*, 81, 304-311.
- PIERRON, F., BAUDRIMONT, M., DUFOUR, S., ELIE, P., BOSSY, A., BALOCHE, S., MESMER-DUDONS, N., GONZALEZ, P., BOURDINEAUD, J. P. & MASSABUAU, J. C. 2008. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environmental Science & Technology*, 42, 4607-4612.
- PIERRON, F., BOURRET, V., ST-CYR, J., CAMPBELL, P. G. C., BERNATCHEZ, L. & COUTURE, P. 2009. Transcriptional responses to environmental metal exposure in wild yellow perch (*Perca flavescens*) collected in lakes with differing environmental metal concentrations (Cd, Cu, Ni). *Ecotoxicology*, 18, 620-631.
- PLAYLE, R. C., GENSEMER, R. W. & DIXON, D. G. 1992. Copper Accumulation on Gills of Fathead Minnows - Influence of Water Hardness, Complexation and Ph of the Gill Microenvironment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 381-391.
- POLAK-JUSZCZAK, L. 2012. Bioaccumulation of mercury in the trophic chain of flatfish from the Baltic Sea. *Chemosphere*, 89, 585-591.
- POPE, C. A., 3RD, BURNETT, R. T., THUN, M. J., CALLE, E. E., KREWSKI, D., ITO, K. & THURSTON, G. D. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*, 287, 1132-41.
- POPE, C. A., 3RD, BURNETT, R. T., THURSTON, G. D., THUN, M. J., CALLE, E. E., KREWSKI, D. & GODLESKI, J. J. 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*, 109, 71-7.
- POPE, C. A., 3RD, TURNER, M. C., BURNETT, R. T., JERRETT, M., GAPSTUR, S. M., DIVER, W. R., KREWSKI, D. & BROOK, R. D. 2015. Relationships between fine particulate air pollution, cardiometabolic disorders, and cardiovascular mortality. *Circ Res*, 116, 108-15.
- PRAKASH, Y. S., PABELICK, C. M. & SIECK, G. C. 2017. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*, 152, 618-626.
- PRUEITT, R. L., LI, W., CHANG, Y. C., BOFFETTA, P. & GOODMAN, J. E. 2020. Systematic review of the potential respiratory carcinogenicity of metallic nickel in humans. *Crit Rev Toxicol*, 50, 605-639.
- PYLE, G. & COUTURE, P. 2012. Nickel. *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, 31a, 253-289.
- QIAO, H. T., LIU, W. Y., GU, H. Y., WANG, D. F. & WANG, Y. 2015. The Transport and Deposition of Nanoparticles in Respiratory System by Inhalation. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
- RAFIKOVA, O., AL GHOULEH, I. & RAFIKOV, R. 2019. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development. *Antioxid Redox Signal*, 31, 933-953.
- RAGSDALE, S. 2005. Nickel enzymes and cofactors. *Encyclopedia of inorganic chemistry*, 6, 3378 - 3393.
- RECK, B. K., MULLER, D. B., ROSTKOWSKI, K. & GRAEDEL, T. E. 2008. Anthropogenic nickel cycle: insights into use, trade, and recycling. *Environ Sci Technol*, 42, 3394-400.
- RENAULT, S., DAVERAT, F., PIERRON, F., GONZALEZ, P., DUFOUR, S., LANCELEUR, L., SCHAFFER, J. & BAUDRIMONT, M. 2011. The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics:

- Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1573-1577.
- RIEUSSET, J. 2017. Endoplasmic reticulum-mitochondria calcium signaling in hepatic metabolic diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1864, 865-876.
- RUNO, J. R. & LOYD, J. E. 2003. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 361, 1533-44.
- SABELLA, S., CARNEY, R. P., BRUNETTI, V., MALVINDI, M. A., AL-JUFFALI, N., VECCHIO, G., JANES, S. M., BAKR, O. M., CINGOLANI, R., STELLACCI, F. & POMPA, P. P. 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052-61.
- SAIEG, M. A., CURY, P. M., GODLESKI, J. J., STEARNS, R., DUARTE, L. G., D'AGOSTINO, L., KAHN, H., PINTO, E. M., MAUAD, T., SALDIVA, P. H. & BERNARDI, F. D. 2011. Differential elemental distribution of retained particles along the respiratory tract. *Inhal Toxicol*, 23, 459-67.
- SALIEZ, J., BOUZIN, C., RATH, G., GHISDAL, P., DESJARDINS, F., REZZANI, R., RODELLA, L. F., VRIENS, J., NILIUS, B., FERON, O., BALLIGAND, J. L. & DESSY, C. 2008. Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation*, 117, 1065-74.
- SANCHEZ, A., ALVAREZ, J. L., DEMYDENKO, K., JUNG, C., ALPIZAR, Y. A., ALVAREZ-COLLAZO, J., COKIC, S. M., VALVERDE, M. A., HOET, P. H. & TALAVERA, K. 2017. Silica nanoparticles inhibit the cation channel TRPV4 in airway epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, 14, 43.
- SAQUIB, Q., SIDDIQUI, M. A., AHMAD, J., ANSARI, S. M., FAISAL, M., WAHAB, R., ALATAR, A. A., AL-KHEDHAIRY, A. A. & MUSARRAT, J. 2018. Nickel Oxide Nanoparticles Induced Transcriptomic Alterations in HEPG2 Cells. *Adv Exp Med Biol*, 1048, 163-174.
- SCHMID, O., MOLLER, W., SEMMLER-BEHNKE, M., FERRON, G. A., KARG, E., LIPKA, J., SCHULZ, H., KREYLING, W. G. & STOEGER, T. 2009. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers*, 14 Suppl 1, 67-73.
- SCHWARZ, D. S. & BLOWER, M. D. 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73, 79-94.
- SEFERIAN, A. & SIMONNEAU, G. 2014. [Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification]. *Presse Med*, 43, 935-44.
- SENOH, H., KANO, H., SUZUKI, M., OHNISHI, M., KONDO, H., TAKANOBU, K., UMEDA, Y., AISO, S. & FUKUSHIMA, S. 2017. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J Occup Health*, 59, 112-121.
- SHERIDAN, M. A. 1988a. Exposure to seawater stimulates lipid mobilization from depot tissues of juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*O. tshawytscha*) salmon. *Fish Physiol Biochem*, 5, 173-80.
- SHERIDAN, M. A. 1988b. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol B*, 90, 679-90.
- SHIMIZU, S., NARITA, M. & TSUJIMOTO, Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399, 483-7.
- SHIMODA, L. A., SHAM, J. S. & SYLVESTER, J. T. 2000. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiol Res*, 49, 549-60.
- SHIN, S. W., SONG, I. H. & UM, S. H. 2015. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials*, 5, 1351-1365.
- SIES, H., BERNDT, C. & JONES, D. P. 2017. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*, 86, 715-748.
- SIMONNEAU, G., GATZOULIS, M. A., ADATIA, I., CELERMAJER, D., DENTON, C., GHOFRANI, A., GOMEZ SANCHEZ, M. A., KRISHNA KUMAR, R., LANDZBERG, M., MACHADO, R. F.,

- OLSCHEWSKI, H., ROBBINS, I. M. & SOUZA, R. 2013. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62, D34-41.
- SINGH, A. N., ZENG, D. H. & CHEN, F. S. 2005. Heavy metal concentrations in redeveloping soil of mine spoil under plantations of certain native woody species in dry tropical environment, India. *J Environ Sci (China)*, 17, 168-74.
- SOW, A. Y., ISMAIL, A., ZULKIFLI, S. Z., AMAL, M. N. & HAMBALI, K. A. 2019. Survey on Heavy Metals Contamination and Health Risk Assessment in Commercially Valuable Asian Swamp Eel, *Monopterus albus* from Kelantan, Malaysia. *Sci Rep*, 9, 6391.
- ST-JEAN, A., BARGUIL, Y., DOMINIQUE, Y., LE BOT, B., AYOTTE, P. & CORDIER, S. 2018. Nickel and associated metals in New Caledonia: Exposure levels and their determinants. *Environ Int*, 118, 106-115.
- STRATAKIS, N., CONTI, D. V., BORRAS, E., SABIDO, E., ROUMELIOTAKI, T., PAPADOPOULOU, E., AGIER, L., BASAGANA, X., BUSTAMANTE, M., CASAS, M., FARZAN, S. F., FOSSATI, S., GONZALEZ, J. R., GRAZULEVICIENE, R., HEUDE, B., MAITRE, L., MCEACHAN, R. R. C., THEOLOGIDIS, I., URQUIZA, J., VAFEIADI, M., WEST, J., WRIGHT, J., MCCONNELL, R., BRANTSÆTER, A. L., MELTZER, H. M., VRIJHEID, M. & CHATZI, L. 2020. Association of Fish Consumption and Mercury Exposure During Pregnancy With Metabolic Health and Inflammatory Biomarkers in Children. *JAMA Netw Open*, 3, e201007.
- SUN, Z., GONG, C., REN, J., ZHANG, X., WANG, G., LIU, Y., REN, Y., ZHAO, Y., YU, Q., WANG, Y. & HOU, J. 2020. Toxicity of nickel and cobalt in Japanese flounder. *Environ Pollut*, 263, 114516.
- SUNDERMAN, F. W., JR. 1989. Mechanisms of nickel carcinogenesis. *Scand J Work Environ Health*, 15, 1-12.
- SUNDERMAN, F. W., JR., MORGAN, L. G., ANDERSEN, A., ASHLEY, D. & FOROUHAR, F. A. 1989. Histopathology of sinonasal and lung cancers in nickel refinery workers. *Ann Clin Lab Sci*, 19, 44-50.
- SURESH, K. & SHIMODA, L. A. 2017. Endothelial Cell Reactive Oxygen Species and Ca(2+) Signaling in Pulmonary Hypertension. *Adv Exp Med Biol*, 967, 299-314.
- TAMURA, Y., PHAN, C., TU, L., LE HIRESS, M., THUILLET, R., JUTANT, E. M., FADEL, E., SAVALE, L., HUERTAS, A., HUMBERT, M. & GUIGNABERT, C. 2018. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 128, 1956-1970.
- TAUSKELA, J. S., COMAS, T., HEWITT, K., MONETTE, R., PARIS, J., HOGAN, M. & MORLEY, P. 2001. Cross-tolerance to otherwise lethal N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical cultures. *Neuroscience*, 107, 571-84.
- TELES, M., PACHECO, M. & SANTOS, M. A. 2005. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure-Influence of preexposure to a PAH-like compound. *Environ Toxicol*, 20, 92-9.
- TESCH, F. 2003. The eel. *Edition blackwell publishing*, 1-408.
- THUROW, F. 1959. On the fishing question and growth of the eel in the western Baltic Sea. *Time of Fisch*, 8, 597-626.
- TJALVE, H., GOTTOFREY, J. & BORG, K. 1988. Bioaccumulation, Distribution and Retention of Ni-63(2+) in the Brown Trout (*Salmo-Trutta*). *Water Research*, 22, 1129-1136.
- TORREILLES, J. & GUERIN, M. C. 1990. Nickel(II) as a Temporary Catalyst for Hydroxyl Radical Generation. *Febs Letters*, 272, 58-60.
- TRAN, Q. K., OHASHI, K. & WATANABE, H. 2000. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 48, 13-22.
- TRAN, Q. K. & WATANABE, H. 2006. Calcium signalling in the endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 145-87.

- TRUMP, B. F. & BEREZESKY, I. K. 1995. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*, 9, 219-28.
- TSUKAMOTO, K. 1992. Discovery of the spawning area for the Japanese eel. *Nature* 356, 789-791.
- TURAN, F., KARAN, S. & ERGENLER, A. 2020. Effect of heavy metals on toxicogenetic damage of European eels *Anguilla anguilla*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 38047-38055.
- UNTERGASSER, A., NIJVEEN, H., RAO, X., BISSELING, T., GEURTS, R. & LEUNISSEN, J. A. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, 35, W71-4.
- USACHEV, Y. M., MARCHENKO, S. M. & SAGE, S. O. 1995. Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta. *J Physiol*, 489 (Pt 2), 309-17.
- USERO, J., IZQUIERDO, C., MORILLO, J. & GRACIA, I. 2004. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. *Environment International*, 29, 949-956.
- VAN DER OOST, R., J, B. & N, V. P. 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13, 57 - 149.
- VAN GINNEKEN, V. & MAES, G. 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev Fish Biol Fisheries*, 15, 367-398.
- VAN GINNEKEN, V. J. & VAN DEN THILLART, G. E. 2000. Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature*, 403, 156-7.
- VIRTANEN, J. K., RISSANEN, T. H., VOUTILAINEN, S. & TUOMAINEN, T. P. 2007. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem*, 18, 75-85.
- VON DER KAMMER, F., OTTOFUELLING, S. & HOFMANN, T. 2010. Assessment of the physico-chemical behavior of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environments using multi-dimensional parameter testing. *Environ Pollut*, 158, 3472-81.
- WALLING, D. E., OWENS, P. N., CARTER, J., LEEKS, G. J. L., LEWIS, S., MEHARG, A. A. & WRIGHT, J. 2003. Storage of sediment-associated nutrients and contaminants in river channel and floodplain systems. *Applied Geochemistry*, 18, 195-220.
- WALTERS, C. R., CHENG, P., POOL, E. & SOMERSET, V. 2016. Effect of temperature on oxidative stress parameters and enzyme activity in tissues of Cape River crab (*Potamonautes perlatus*) following exposure to silver nanoparticles (AgNP). *J Toxicol Environ Health A*, 79, 61-70.
- WANG, T., CHEN, X., LONG, X., LIU, Z. & YAN, S. 2016. Copper Nanoparticles and Copper Sulphate Induced Cytotoxicity in Hepatocyte Primary Cultures of *Epinephelus coioides*. *PLoS One*, 11, e0149484.
- WATANABE, H., TAKAHASHI, R., ZHANG, X. X., KAKIZAWA, H., HAYASHI, H. & OHNO, R. 1996. Inhibition of agonist-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 225, 777-84.
- WESTERBERG, H. 1998. Short note-oceanographic aspects of the recruitment of eels to the Baltic Sea. *Bull Fr Pêche Piscic*, 349, 177-185.
- WESTERLUND, L., HYLLNER, S. J., SCHOPEN, A. & OLSSON, P. E. 2001. Expression of three vitelline envelope protein genes in arctic char. *Gen Comp Endocrinol*, 122, 78-87.
- WIESNER, M. R., LOWRY, G. V., ALVAREZ, P., DIONYSIOU, D. & BISWAS, P. 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environ Sci Technol*, 40, 4336-45.
- WONG, M. S. & VANHOUTTE, P. M. 2010. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacol Sin*, 31, 1095-102.
- WOOD, C. M. 2012. An Introduction to Metals in Fish Physiology and Toxicology: Basic Principles. *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, 31a, 1-51.

- WOOD, P. G. & GILLESPIE, J. I. 1998. Evidence for mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in permeabilised endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 246, 543-8.
- XIA, T., KOVOCHICH, M., BRANT, J., HOTZE, M., SEMPFF, J., OBERLEY, T., SIOUTAS, C., YE, J. I., WIESNER, M. R. & NEL, A. E. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett*, 6, 1794-807.
- XIANG, J., LI, J., HE, J., TANG, X., DOU, C., CAO, Z., YU, B., ZHAO, C., KANG, F., YANG, L., DONG, S. & YANG, X. 2016. Cerium Oxide Nanoparticle Modified Scaffold Interface Enhances Vascularization of Bone Grafts by Activating Calcium Channel of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8, 4489-99.
- XUE, H. B., JANSEN, S., PRASCH, A. & SIGG, L. 2001. Nickel speciation and complexation kinetics in freshwater by ligand exchange and DPCSV. *Environ Sci Technol*, 35, 539-46.
- YIN, S. A., ISMAIL, A. & ZULKIFLI, S. Z. 2012. Heavy Metals Uptake by Asian Swamp Eel, *Monopterus albus* from Paddy Fields of Kelantan, Peninsular Malaysia: Preliminary Study. *Trop Life Sci Res*, 23, 27-38.
- YING, Z., XU, X., CHEN, M., LIU, D., ZHONG, M., CHEN, L. C., SUN, Q. & RAJAGOPALAN, S. 2013. A synergistic vascular effect of airborne particulate matter and nickel in a mouse model. *Toxicol Sci*, 135, 72-80.
- YOKEL, R. A., LASLEY, S. M. & DORMAN, D. C. 2006. The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 9, 63-85.
- YOUNGER, P. L. 2001. Mine water pollution in Scotland: nature, extent and preventative strategies. *Science of the Total Environment*, 265, 309-326.
- YU, R. & HINKLE, P. M. 2000. Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies withameleon calcium indicators. *J Biol Chem*, 275, 23648-53.
- YU, S., LIU, F., WANG, C., ZHANG, J., ZHU, A., ZOU, L., HAN, A., LI, J., CHANG, X. & SUN, Y. 2018. Role of oxidative stress in liver toxicity induced by nickel oxide nanoparticles in rats. *Mol Med Rep*, 17, 3133-3139.
- ZHANG, D. X. & GUTTERMAN, D. D. 2011. Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 57, 133-9.
- ZHANG, H., JI, Z., XIA, T., MENG, H., LOW-KAM, C., LIU, R., POKHREL, S., LIN, S., WANG, X., LIAO, Y. P., WANG, M., LI, L., RALLO, R., DAMOISEAUX, R., TELESKA, D., MADLER, L., COHEN, Y., ZINK, J. I. & NEL, A. E. 2012. Use of metal oxide nanoparticle band gap to develop a predictive paradigm for oxidative stress and acute pulmonary inflammation. *ACS Nano*, 6, 4349-68.
- ZHANG, R., JIA, C., ZHAO, L., PAN, J., NIU, Q. & LIU, R. 2019. Characterization of the interaction between carbon black and three important antioxidant proteins using multi spectroscopy and modeling simulations. *Chemosphere*, 222, 823-830.
- ZHU, Q., LI, C., YU, Z. X., ZOU, P. F., MENG, Q. X. & YAO, C. L. 2016. Molecular and immune response characterizations of IL-6 in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Fish Shellfish Immunol*, 50, 263-73.
- ZIEGELSTEIN, R. C., SPURGEON, H. A., PILI, R., PASSANITI, A., CHENG, L., CORDA, S., LAKATTA, E. G. & CAPOGROSSI, M. C. 1994. A functional ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store is present in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 74, 151-6.

Thèses

- AUFFAN, M. 2007. *Nanoparticules D'oxydes Métalliques: Relations Entre La Réactivité De Surface Et Des Réponses Biologiques* PhD, Université Paul Cézanne.
- DÉGLETAGNE, C. 2012. *Acclimatations des manchots aux contraintes de l'environnement polaire : approches transcriptomique et intégrative sur le manchot Royal (Aptenodytes patagonicus) et le manchot Adélie (Pygoscelis adeliae)*
- (2) (PDF) *Penguin acclimatization to polar environmental constraints : a transcriptomic and integrative study in King (Aptenodytes patagonicus) and Adélie penguins (Pygoscelis adeliae)*. Available from: [accessed Apr 05 2022]. Université Claude Bernard Lyon I.
- DURIF, C. 2003. *La migration d'avalaison de l'anguille européenne Anguilla anguilla: caractérisation des fractions dévalantes phénomène de migration et franchissement d'obstacles*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier.
- PARPAITE, T. 2015. *Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire*. Université de Bordeaux.
- PERRIER, F. 2018. *Nanocontamination d'organismes aquatiques par des particules inorganiques : transfert trophique et impacts toxiques*. PhD, Université de Bordeaux.
- PIERRON, F. 2007. *Etudes des mécanismes de bioaccumulation du cadmium et des effets toxiques associés à différents stades de vie de l'anguille européenne (Anguilla anguilla L.)*. PhD, Université de Bordeaux.

Sites internet

- AIRPARIF. Available: <http://www.airparif.asso.fr/pollution/> [Accessed]. Consulté en mai 2022.
- AIRPARIF 2010. Les différents polluants et leur évolution. Consulté en mai 2022.
- ASSOCE. 2007. *Association pour la lutte contre les maladies respiratoires en Nouvelle-Calédonie* [Online]. Available: <https://assoce.fr/waldec/W9N1000145/ASSOCIATION-POUR-LA-LUTTE-CONTRE-LES-MALADIES-RESPIRATOIRES-EN-NOUVELLE-CALEDONIE> [Accessed]. Consulté en mai 2022.
- CNRS. *Le système respiratoire* [Online]. Available: <https://lejournal.cnrs.fr/appareil-respiratoire> [Accessed]. Consulté en mai 2022.
- CNRT-NICKEL. Available: <https://cnrt.nc> [Accessed]. Consulté en mars 2022.
- ENDEMIANC. 2001. Available: <https://endemia.nc/faune/fiche1207.html> [Accessed]. Consulté en mai 2022.
- EUR-LEX. 2007. *Règlement (CE) n° 1100/2007 du Conseil du 18 septembre 2007 instituant des mesures de reconstitution du stock d'anguilles européennes* [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32007R1100> [Accessed]. Consulté en juin 2022.
- LEESU. [Accessed]. Consulté en mai 2022.
- LEGIFRANCE. 1996. Available: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000381337/> [Accessed]. Consulté en mars 2022.
- LEGIFRANCE. 2010. Available: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022941254&categorieLien=id> [Accessed]. Consulté en mars 2022.
- SANTÉPUBLIQUEFRANCE. Available: <https://www.santepubliquefrance.fr/> [Accessed]. Consulté en mai 2022.

USGS. 2022. USGS [Online]. Available: <https://www.usgs.gov/centers/national-minerals-information-center/nickel-statistics-and-information> [Accessed 2022]. Consulté en avril 2022.

Manuscrits

BOWEN, H. J. M. 1966. *Trace elements in biochemistry*, London, New York,, Academic Press.

D, R. A. E. B. 2005. *Les Aérosols*.

PATRICK LACOLLEY, D. B., CHANTAL BOULANGER, BIJAN GHALEH, GERVAISE LOIRAND, FLORENCE PINET, JANELISE SAMUEL 2007. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*.

Communications personnelles

ALLENBACH, M. 2015. Fonctionnement des petits bassins versants miniers. CNRT "Nickel et son environnement".

GUNKEL-GRILLON, P. 2021.

PASCAL ANDUJAR, S. L., PATRICK BROCHARD, JORGE BOCZKOWSKI 2008. Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. *Revue des Maladies Respiratoires*.

WOOD, C. M., FARRELL, A. P. & BRAUNER, C. J. 2012. *Homeostasis and toxicology of non-essential metals*, Amsterdam, Academic Press.