



HAL
open science

Evaluation du potentiel phytoremédiateur et stimulateur sur les plantes, et du devenir environnemental des oxydes de fer nanoparticulaires

Léa Mounier

► To cite this version:

Léa Mounier. Evaluation du potentiel phytoremédiateur et stimulateur sur les plantes, et du devenir environnemental des oxydes de fer nanoparticulaires. Biologie végétale. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB030 . tel-04401879

HAL Id: tel-04401879

<https://theses.hal.science/tel-04401879>

Submitted on 18 Jan 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation
Spécialité : Biologie et Physiologie végétales

Par

Léa MOUNIER

« Évaluation du potentiel phytoremédiateur et stimulateur sur les plantes, et du devenir environnemental des oxydes de fer nanoparticulaires »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 17 Juillet 2023

Unité de recherche: UMR 6553

Rapporteurs avant soutenance :

Laurence Denaix	Directrice de recherches, INRAE Villenave d'Ormon
Cécile Quantin	Professeure, Université Paris Saclay

Composition du Jury :

Président :	Laurence Denaix	Directrice de recherche, INRAE Villenave d'Ormon
Rapporteurs :	Laurence Denaix Cécile Quantin	Directrice de recherche, INRAE Villenave d'Ormon Professeure, Université Paris Saclay
Examineurs :	Fabien Grasset Fabienne Tatin-Froux	Directeur de recherche, Université Rennes Maître de Conférences, Université Franche Comté
Directeur de thèse :	Francisco Cabello Hurtado	Maître de Conférences, Université Rennes
Co-Directeur de thèse :	Mathieu Pédrot	Maître de Conférences, Université Rennes

*Aux miens,
À Francisco et Mathieu,
À mes compagnons de thèse,
Et à tous ceux croisés en chemin,
Qui ont permis à ce travail d'aboutir.*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique	5
1. Les éléments traces dans le sol.....	6
1.1. Définition et origines des éléments traces dans le sol.....	6
1.2. Dispersion des éléments traces dans le sol et l'environnement.....	8
1.3. Toxicité des éléments traces.....	10
1.4. Devenir des éléments traces dans le sol.....	13
1.4.1. Spéciation et mobilité des éléments traces dans le sol.....	13
1.4.2. Facteurs influençant le devenir des éléments traces dans le sol.....	14
1.4.3. Les effets des plantes sur la spéciation et la mobilité des éléments traces.....	16
1.4.4. Prélèvement et accumulation des éléments traces par les plantes.....	17
2. Remédiation des sols pollués par les éléments traces.....	20
2.1. Généralités.....	20
2.2. La phytoremédiation.....	23
2.2.1. Les différents procédés.....	23
2.2.2. Les avantages.....	26
2.2.3. Les limites.....	27
3. Les nanoparticules d'oxydes de fer : une nouvelle technologie au service de la phytoremédiation.....	29
3.1. Les nanoparticules d'oxydes de fer : généralités.....	29
3.1.1. Définition et contexte.....	29
3.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	32
3.1.2.1. Généralités.....	32
3.1.2.2. Ratio Fe(II)/Fe(III).....	33
3.1.2.3. Taille et réactivité chimique.....	34
3.2. Les nanoparticules pour la remédiation environnementale.....	36
3.3. Devenir des nanoparticules dans les sols.....	38

3.4. Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur les plantes.....	39
3.4.1. Effets sur la physiologie végétale.....	40
3.4.2. Stress oxydatif.....	42
3.4.3. Equilibre hydrique.....	43
3.4.4. Translocation et accumulation dans les plantes.....	44
4. Objectifs de la thèse.....	48
Bibliographie.....	50
CHAPITRE 2 : Démarche générale.....	65
1. Démarche.....	65
2. Synthèse en laboratoire des nanoparticules de magnétite.....	67
3. Choix du sol et historique.....	68
4. Design expérimental.....	69
Bibliographie.....	72
CHAPITRE 3 : Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le comportement et devenir du plomb dans le sol et sur l'amélioration de la phytoremédiation.....	74
<i>Article: Impact of iron oxide nanoparticles on a lead polluted water-soil-plant system under alternating periods of water stress.</i>	
Abstract.....	77
1. Introduction.....	78
2. Materials and methods.....	80
2.1. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles.....	80
2.2. Experimental design.....	81
2.3. Biological assays.....	82
2.3.1. Pigment content.....	83
2.3.2. Amino acid content.....	83
2.3.3. Determination of lipid peroxidation.....	84

2.3.4. Soluble protein extraction and quantification.....	84
2.3.5. Determination of POD activity.....	84
2.3.6. Determination of SOD activity.....	85
2.4. Leaf angle measurement.....	85
2.5. Relative water content.....	85
2.6. Geochemical analyses.....	86
2.6.1 Trace elements measurements.....	86
2.6.2. Determination of dissolved organic carbon.....	86
2.6.3. Determination of soil water potential.....	87
2.7. Magnetic susceptibility measurements.....	87
2.8. Statistical analysis.....	87
3. Results and discussion.....	88
3.1. Physiological and biochemical responses of <i>Helianthus annuus</i> plants exposed to NPsMagn in a Pb pollution context.....	88
3.1.1. Growth parameters.....	88
3.1.2. Pigment contents.....	90
3.1.3. Concentrations of total free amino acids.....	91
3.1.4. Oxidative stress response.....	92
3.2. Fate of NPsMagn and Pb in a water-soil-plant system.....	94
3.2.1. Uptake and translocation of NPsMagn from soil to plant.....	94
3.2.2. Chemical exchanges between plants, soil and soil solution.....	97
3.3. Water stress response during interaction with NPsMagn-Pb.....	100
4. Conclusions.....	100
References.....	106
CHAPITRE 4 : Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur un sol contaminé par un mélange d'éléments traces et nano-phytoextraction par le tournesol.....	116
<i>Article en préparation: Effects of IONPs on a multimetal contaminated soils and phytoextraction by sunflower</i>	
Abstract.....	118

1. Introduction.....	119
2. Materials and methods.....	121
2.1. Iron oxide nanoparticles synthesis.....	121
2.2. Experimental design.....	121
2.3. Biological assays.....	124
2.3.1. Lipid peroxidation determination.....	124
2.3.2. Extraction and quantification of soluble proteins.....	124
2.3.3. POD activity determination.....	125
2.3.4. SOD activity determination.....	125
2.4. Leaf angle measurements.....	125
2.5. Water content.....	126
2.6. Geochemical analyses.....	126
2.6.1. Trace elements measurements.....	126
2.7. Statistical analysis.....	127
3. Results and discussion.....	127
3.1. Physiological and biochemical reponses of sunflower plants exposed to nanomagnetites in a multimetal pollution context.....	127
3.1.1. Growth parameters.....	127
3.1.2. Oxidative stress response.....	130
3.2. Fate of nanomagnetites and TEs mixture in a water-soil-plant system.....	132
3.2.1. Effect of Fe ₃ O ₄ NPs on TEs remediation by sunflower.....	132
3.2.2. Effect of nanomagnetites on Fe and TEs contents in soil solution.....	137
3.3. Effects of nanomagnetites on water stress under multimetal contamination.....	140
4. Conclusions.....	144
References.....	146
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	157
Annexes.....	162

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1 : Sources de pollution des sols par les ETs. (A) Les principales sources anthropiques peuvent être classées en trois catégories : agricoles, industrielles et minières (Antoniadis <i>et al.</i> 2019). (B) Exemple de la part des différents apports d'ETs dans les sols agricoles français (ADEME 2007).....	7
Figure 2 : Schéma de la dispersion des ETs dans l'environnement (Baize 2007).....	10
Figure 3 : Différentes formes et localisation des ETs dans les sols (d'après Baize, 2007).....	14
Figure 4 : Les différentes stratégies de phytoremédiation (Hou <i>et al.</i> 2020).....	24
Figure 5 : Marché mondial des NPs d'oxydes métalliques par application (%) en 2016 (d'après Global Industry Report).....	32
Figure 6 : Evolution du ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} en fonction du temps (cercles bleus) (Demangeat <i>et al.</i> 2018).....	34
Figure 7 : Pourcentage d'atomes localisés à la surface d'une nanoparticule en fonction de son diamètre (d'après Auffan, 2007).....	35
Figure 8 : Exemple d'interactions physicochimiques à la surface d'une nanoparticule de magnétite (d'après Auffan <i>et al.</i> 2009).....	36
Figure 9 : Effets décrits des NPs-OxFe sur la physiologie des plantes pendant l'assainissement de l'environnement dans la littérature (d'après Martínez-Fernández <i>et al.</i> 2017).....	40
Figure 10 : Interaction des NPs avec les différents composants du sol et de la biosphère. (Martínez-Fernández <i>et al.</i> 2017).....	42
Figure 11 : Schéma des voies d'absorption et de translocation des NPs dans les plantes (Lv <i>et al.</i> 2019).....	45

CHAPITRE 2

Figure 1 : Synthèse des nanoparticules de magnétite (gauche) et image MET de nanomagnétites (droite).....	67
Figure 2 : Photographie aérienne du site de prélèvement avant (gauche) et après urbanisation (droite) de la zone.....	68
Figure 3 : Photographie du dispositif expérimental.....	71

CHAPITRE 3

Figure 1 Dry weight (g) of leaves (dark green) and stems (light green) of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb.....	89
Figure 2 Pigment content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ DW) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb.....	90
Figure 3 Total free amino acids (mgeq leucine g^{-1} DW) (histogram) and proline content (mg g^{-1} DW) (curve) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb.....	92
Figure 4 Lipid peroxidation and antioxidant activities measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb.....	94
Figure 5 Iron (A) and lead (C) concentrations (mg kg^{-1} DW) in leaves (dark green) and stems (light green) measured by ICP-MS after 90 days of growth in the different studied soils. Cumulative amounts of iron (B) and lead (D) leached ($\mu\text{g pot}^{-1}$) over the experimentation (day 10 to day 75) measured by ICP-MS.....	97
Figure 6 Total amount of dissolved organic carbon leached over the experiment (mg).....	100
Figure 7 Stress water response measured during and after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb.....	102

CHAPITRE 4

Figure 1 Fresh weight (g) and height (cm) (curve) of leaves (green), stems (light green), and flower buds (yellow) of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing TEs, NPs-TEs, NPs@CA-TEs or μ Ps-TEs.....	129
Figure 2 Lipid peroxidation and antioxidant activities measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing TEs, NPs-TEs, NPs@CA-TEs or μ Ps-TEs.....	131
Figure 3 Iron and trace elements quantity (μg) in stems (light green) leaves (green) and flower buds (yellow) measured by ICP-MS after 90 days of growth in the different studied soils.....	133
Figure 4 Cumulative amount of iron and trace elements leached ($\mu\text{g pot}^{-1}$) over the experiment (day 10 to 75) measured by ICP-MS.....	138
Figure 5 Stress water response measured during and after 90 days of growth in the different studied soils.....	143

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1 : Teneurs en éléments traces extractible à l'EDTA des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France (Groupement d'intérêt scientifique sur les sols (France) 2011).....	9
Tableau 2 : Teneurs limites en éléments métalliques dans les boues et dans les sols susceptibles de recevoir ces boues, selon l'arrêté du 8 janvier 1998 (J.O. n°26 du 31 janvier 1998).....	21
Tableau 3 : Cinq premiers secteurs d'activités utilisant des NPs en France en 2018 (Direction générale de la prévention des risques 2019).....	30
Tableau 4 : Synthèse des principales études sur les effets favorables ou neutres des NP-OxFe sur les plantes.....	47

CHAPITRE 2

Tableau 1 : Caractérisation physicochimique du sol.....	69
--	-----------

CHAPITRE 3

Table 1 Magnetite nanoparticles concentration (mg kg⁻¹) in sunflower roots and aerial parts, and in the soil samples, calculated from magnetic susceptibility measurements.....	95
---	-----------

CHAPITRE 4

Table 1 Trace elements threshold limit in soil (mg kg⁻¹ DW) and TEs concentration added in pot (mM pot⁻¹).....	123
---	------------

INTRODUCTION

Depuis la fin du XIXème siècle, la pollution des écosystèmes par les éléments traces (ETs) n'a cessé d'augmenter suite à l'accroissement de la population, l'urbanisation, l'expansion des activités industrielles et agricoles (Borrelli *et al.* 2017). Pourtant les sols et l'eau sont des ressources limitées et considérées comme non renouvelables à l'échelle humaine qui se retrouvent aujourd'hui menacées par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel et urbain. Ces éléments traces qui s'accumulent dans les sols sont par nature non biodégradables et potentiellement toxiques pour un grand nombre d'organismes. Leur présence accrue dans l'environnement augmente ainsi le risque d'exposition des êtres vivants : microorganismes, plantes, animaux, et l'Homme, qui se trouve *in fine* en bout de chaîne alimentaire. Il est donc primordial de développer des solutions de réhabilitation efficaces et durables visant à limiter les risques liés à la pollution aux éléments traces, et à restaurer et préserver les ressources en eaux et en sols.

Depuis une vingtaine d'années, de nouvelles méthodes biologiques de traitement des sols basées sur l'utilisation des plantes sont utilisées afin de pallier les limites environnementales, économiques et sociétales des méthodes conventionnelles employées pour l'assainissement des sols pollués comme l'excavation, le confinement ou encore l'incinération. La phytoremédiation s'est imposée comme une stratégie biologique prometteuse pour l'élimination *in situ* de nombreux contaminants (Srivastav *et al.* 2018). De

plus, elle apparaît ainsi comme étant une méthode moins coûteuse mais également plus respectueuse des sols et de l'environnement (Salt *et al.* 1995). Les techniques de phytoextraction et de phytostabilisation sont les deux principales méthodes complémentaires employées pour le traitement des éléments traces. La première utilise les capacités des plantes à prélever les éléments traces du sol, les transporter et les accumuler dans les parties aériennes (Wang *et al.* 2020). Elles pourront par la suite être récoltées et traitées pour gérer l'évacuation des ETs. Quant à elle, la seconde utilise le couvert végétal afin de diminuer la mobilité des éléments traces avec pour objectif de les immobiliser *in situ* dans les sols, réduisant ainsi les risques de dispersion dans l'environnement (Etim 2012). Cependant, bien que ces processus aient fait leurs preuves, plusieurs limites à leur pérennisation subsistent. Des recherches commencent à être réalisées afin d'optimiser l'efficacité ainsi que la généralisation à large échelle des techniques de phytoremédiation.

Depuis les années 1980 les nanosciences connaissent un véritable essor et les techniques et connaissances acquises depuis lors dans ce domaine ont permis une véritable révolution technologique. Les nanoparticules sont des objets d'origine naturelle ou anthropique dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm (ANSES 2014). Ces dernières années, les produits issus des nanotechnologies ou contenant des nanoparticules se sont largement répandus dans notre quotidien. On les retrouve ainsi dans des domaines aussi divers et variés que le bâtiment, l'automobile, l'électronique, l'industrie chimique, l'environnement, l'énergie ou la bien santé. Ces utilisations grandissantes ont accru la production de nanoparticules et, par la même occasion, mis en lumière la nécessité d'apporter des connaissances vis-à-vis de leurs impact sanitaire et environnemental (Patil *et al.* 2018).

Les nanotechnologies, telles que les oxydes de fer nanoparticulaires, offrent des affinités spécifiques pour l'adsorption des éléments traces et leur application a rapidement été étendue à la gestion environnementale (Martínez-Fernández *et al.* 2017). Leur surface spécifique importante ajoutée au nombre élevé de sites de surface actifs engendrent des capacités d'adsorption élevées. Ces propriétés les rendent très prometteurs en tant qu'amendements pour le traitement des sols contaminés. A leur surface, des réactions acido-basiques, d'oxydo-réduction, d'adsorption de surface ou de co-précipitation contrôlent la mobilité et la spéciation des éléments traces, influant sur leur biodisponibilité. Plusieurs travaux ont d'ores et déjà montrés la capacité d'adsorption des éléments traces à la surface

de nanoparticules de magnétite (Fe_3O_4) et maghémite (Fe_2O_3), soulignant leur potentiel d'application dans les domaines de la remédiation des sols et eaux polluées (Tang & Lo 2013). Ainsi, la nano-remédiation, qui se définit comme l'utilisation de nanoparticules pour la remédiation de l'environnement, permet de réduire les coûts et temps de traitement des sites contaminés, et réduire la disponibilité et dispersion de certains contaminants dans les écosystèmes (Zhang 2003; Karn *et al.* 2009).

L'atténuation de la toxicité des éléments traces par leur immobilisation dans le sol permet la croissance et le développement des plantes pendant la phytoremédiation, mais il existe un ensemble de preuves indiquant que les nanoparticules d'oxydes de fer eux-mêmes peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et néfastes sur les systèmes végétaux tant aux niveaux physiologique, biochimique, nutritionnel que génétique. Les études écotoxicologiques permettent de bien comprendre leurs interactions avec les plantes, et un nombre croissant de publications ont tenté de clarifier et de quantifier leurs risques potentiels et leurs conséquences pour les plantes (Zhu *et al.* 2008; Iannone *et al.* 2016; Palmqvist *et al.* 2017; Demangeat *et al.* 2021). Cependant, de nombreux résultats sont contradictoires et la sécurité des nanomatériaux manufacturés représente toujours un obstacle à leur utilisation large et innovante dans la phytoremédiation. Les effets positifs et négatifs des nanomatériaux sur les plantes auront un impact sur la qualité de l'environnement et devront être pris en compte pour évaluer leur applicabilité.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cet esprit, en proposant une étude basée sur le développement d'une solution de nano-phytoremédiation des éléments traces, ayant pour objectif de pouvoir obtenir une dépollution satisfaisante des sols et ceci dans un temps de traitement raisonnable. Le devenir ainsi que la compatibilité environnementale tout au long du cycle de vie des nanoparticules d'oxydes de fer seront aussi évalués. Bien que les études de leurs impacts sur les plantes soient de plus en plus nombreuses, peu d'entre elles portent sur la toxicité chronique d'une exposition prolongée aux nanoparticules d'oxydes de fer. Il est donc nécessaire d'évaluer si leur utilisation combinée à la phytoremédiation correspond à une pratique s'inscrivant dans la gestion durable de la qualité des sols, eaux et agro/écosystèmes.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique sur l'état actuel des connaissances sur les sols pollués aux éléments traces, en s'intéressant à la toxicité des contaminants, leur spéciation et devenir dans

l'environnement ainsi que leur dépollution par phytoremédiation. Les nanoparticules d'oxydes de fer ainsi que l'intérêt de la nanoremédiation y sont également développées. Cette partie est ensuite suivie d'un second chapitre présentant la démarche générale de ces travaux. Le troisième chapitre est consacré à la première expérimentation développée au cours de ces travaux de thèse. Celle-ci porte sur l'étude de l'impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le comportement et le devenir du plomb dans un système eau-sol-plante ; ainsi que leur potentiel participation à l'amélioration de la phytoextraction par le tournesol. Enfin, le quatrième chapitre présente la seconde expérimentation majeure mise en place focalisée sur l'étude de l'effet de la présence d'un cocktail d'éléments traces sur une culture à long terme de tournesol, et ceux associée à l'application de nanoparticules de magnétites dans l'objectif de renforcer les processus de phytoremédiation.

CHAPITRE 1. Synthèse bibliographique

1. Les éléments traces dans le sol

1.1. Définition et origines des éléments traces dans le sol

Par convention, les éléments traces (ETs) regroupent les éléments du sol dont la concentration moyenne dans la croûte terrestre est inférieure à 0,1% (Baize 1997) ou 100 mg.kg⁻¹ (Hooda 2010). Cette nomenclature tend à remplacer progressivement celle de « métaux lourds » car sa définition englobait autant les métaux que les métalloïdes (comme l'arsenic) et comprenait des éléments toxiques réellement lourds et d'autres l'étant moins.

Les ETs sont des constituants naturels du fond pédogéochimique. Les principales sources naturelles sont l'érosion de la roche associée au dépôt de particules emportées par le vent, les éruptions volcaniques, les incendies de forêt et les sources biogènes (Nriagu 1989). Bien que les apports provenant de sources naturelles peuvent constituer une charge importante d'éléments traces dans le sol, notamment dans les sols développés à partir de roches magmatiques plutoniques, la contribution des sources anthropiques pour de nombreux ETs est généralement plusieurs fois supérieure à celle des sources naturelles (Nriagu & Pacyna 1988), ce qui soulève des préoccupations évidentes en matière d'effets sur l'environnement et sur la santé. Les principales sources anthropiques d'apports d'ETs dans les sols sont les suivantes (**Figure 1A et B**) :

- Dépôts atmosphériques provenant de la combustion du charbon et des carburants, de l'extraction, fonte et fabrication de métaux ferreux et non ferreux, de l'incinération des déchets, de la production d'engrais phosphatés et de ciment, et de la combustion du bois ;
- L'épandage de boues de station d'épuration, d'amendements organiques et d'autres déchets et coproduits organiques provenant de l'agriculture et de l'industrie agro-alimentaire ;
- L'épandage de coproduits et de déchets industriels, y compris les boues de l'industrie papetière, les cendres volantes de charbon et de bois ;
- Utilisation d'engrais, de chaux et de produits biocides et phytopharmaceutiques dans l'agriculture ;
- Dépôts liés aux activités industrielles (e.g. site des Anciennes Cartoucheries de Rennes) ou militaire.

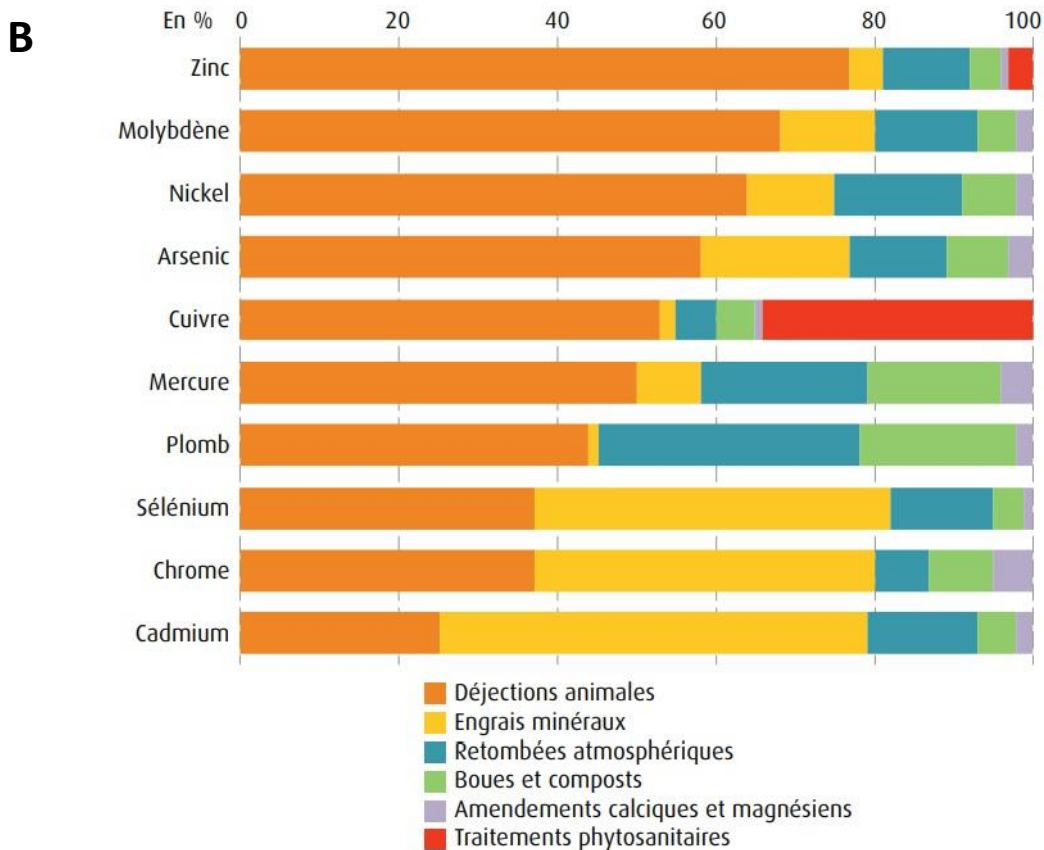
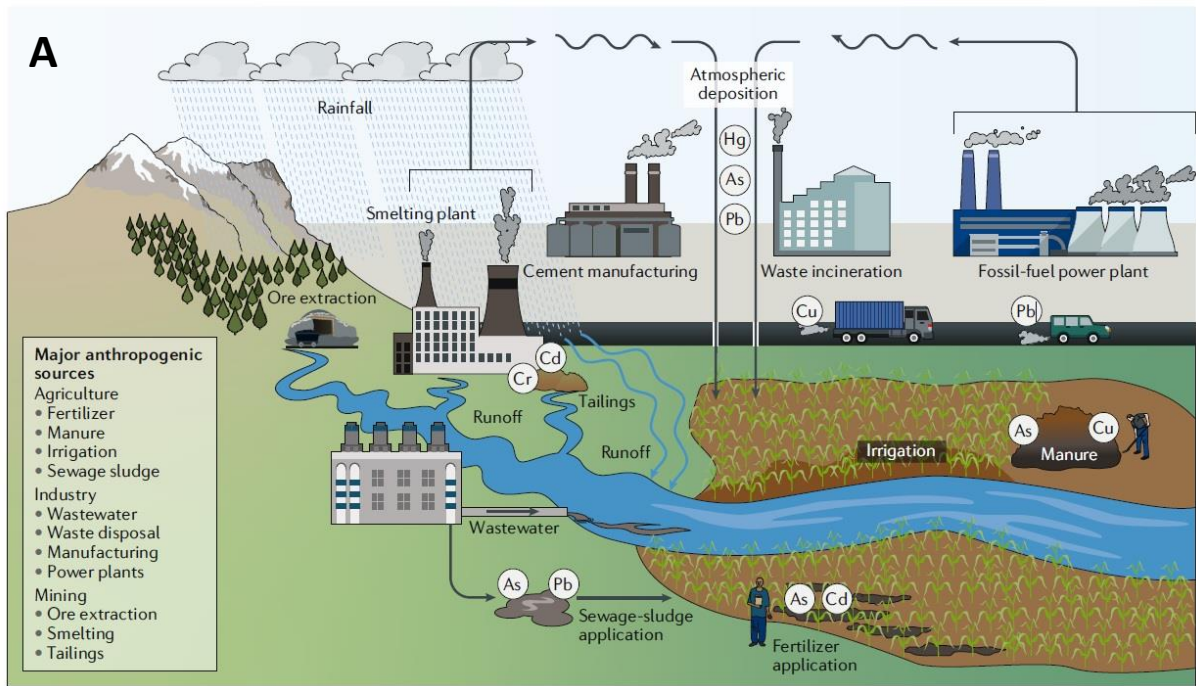


Figure 1 : Sources de pollution des sols par les ETs. (A) Les principales sources anthropiques peuvent être classées en trois catégories : agricoles, industrielles et minières (Antoniadis *et al.* 2019). (B) Exemple de la part des différents apports d'ETs dans les sols agricoles français (ADEME 2007).

Enfin, on distingue deux types de contamination : les sources ponctuelles vs les sources diffuses. Les sources dites diffuses ont de nombreuses origines mal identifiées et/ou portent sur de longues distances. Les sources ponctuelles concernent une aire de dispersion faible et sont en général liées à une source bien identifiée et proche (Girard *et al.* 2011). Les dépôts atmosphériques peuvent donc par exemple contribuer significativement à augmenter les concentrations en ETs dans les sols et représentent une source importante puisqu'ils sont cumulatifs et difficiles à limiter ou à contrôler (Senesil *et al.* 1999).

1.2. Dispersion des éléments traces dans le sol et l'environnement

La manipulation des ETs par l'Homme n'est pas récente, les premières traces d'utilisation sont attestées dès le VI^{ème} millénaire avant notre ère. Cependant, le développement des activités humaines, les révolutions industrielles et agricoles, ainsi que l'urbanisation ces siècles derniers sont à l'origine d'une contamination et d'une dégradation généralisées des sols (Borrelli *et al.* 2017).

Différentes définitions d'un sol pollué sont présentes dans la littérature. En France, un site pollué est défini comme « un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'une infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement » (BASOL, 2020). On distinguera les termes « contamination » quand il y a un apport anthropique important mais sans effet apparent pour l'environnement ; et « pollution » qui est employée lorsque des apports liés à des activités humaines ont des effets négatifs visibles sur l'environnement (Juste 1988). Les termes « polluant » et « contaminant » sont la plupart du temps synonymes, et dans la suite de ce manuscrit, l'un ou l'autre seront employés indifféremment.

Une étude réalisée en 2018 prévoit la présence de 2,8 millions de sites potentiellement contaminés par les ETs sur le territoire de l'Union Européenne (Pérez & Eugenio 2018). En France, les ETs représentent la seconde famille de polluants identifiés dans les sols et les eaux après les hydrocarbures et sont responsables de la contamination de plus de 48 % des sols pollués et 44 % des eaux (Antoni 2013). Aujourd'hui les ETs les plus fréquemment rencontrés dans le sol sont l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), et le plomb (Pb). En France, le programme de Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS)

quantifie chaque décennie la teneur en ETs sur les territoires métropolitain et d'Outre-mer (**Tableau 1**). Ce suivi permet ainsi de répertorier les zones naturellement riches en ETs et celles où des contaminations diffuses d'origine anthropique sont suspectées.

Tableau 1 : Teneurs en éléments traces extractible à l'EDTA des horizons de surface (0-30 cm) des sols de France (Groupement d'intérêt scientifique sur les sols (France) 2011).

Elément trace	Teneur minimale totale (mg kg ⁻¹)	Teneur maximale totale (mg kg ⁻¹)	Teneur sur la ville de Rennes (mg kg ⁻¹)
Cd	0,02	5,53	<0,25
Cu	1	508	20 < Cu < 50
Pb	< 30	624	< 30
Zn	5	1231	60 < Zn <100

Il a ainsi été estimé que lors des deux dernières décennies du XXème siècle, ce ne sont pas moins de 22 000 t de Cd, 939 000 t de Cu, 783 000 t de Pb et 1 350 000 t de Zn qui ont été relarguées dans l'environnement (Singh *et al.* 2003). Malgré la prise de conscience croissante des dommages causés par les ETs dans les sols (cf section 1.3), leur rôle essentiel dans l'industrie moderne signifie que leur extraction et leur utilisation continuent d'augmenter. Au cours des 50 dernières années, la production mondiale minière de Cr et de Pb a augmenté respectivement de 514 % (37,5 millions de tonnes par an) et de 232 % (11,3 millions de tonnes par an) (Idoine *et al.* 2022). Dans certains cas, les ETs sont même nécessaires aux technologies renouvelables : le Cd et le Pb, par exemple, sont utilisés dans les cellules des batteries plomb-acide et nickel-cadmium (Järup 2003), le Pb est utilisé dans les cellules solaires et le Ni est utilisé dans les batteries des voitures électriques (Yin *et al.* 2015; Li *et al.* 2016). En raison de leur fabrication intensive, de leur utilisation généralisée et de leur tendance à s'accumuler par adsorption, absorption et précipitation dans les sols, les ETs sont devenus le type de contaminants le plus répandu dans les sols agricoles (Tóth *et al.* 2016). Les études sur la distribution des ETs dans les écosystèmes montrent aussi que les sols situés à proximité des sites industriels et miniers, des grands réseaux routiers ou de ceux qui ont reçu de fortes applications de boues provenant de stations d'épuration contiennent des niveaux beaucoup plus élevés de ces ETs. De plus les différents types de contamination sont souvent associés à différentes sources. Par exemple, le Pb est particulièrement associé aux activités de transport

en raison de l'utilisation historique du plomb dans l'essence et de l'usure abrasive des composants des véhicules (Motamen Salehi *et al.* 2016). Le traitement des terres avec des engrais minéraux impurs et des amendements organiques est associé à la contamination des sols agricoles par le Cd, Cu et Zn (Lu *et al.* 2012).

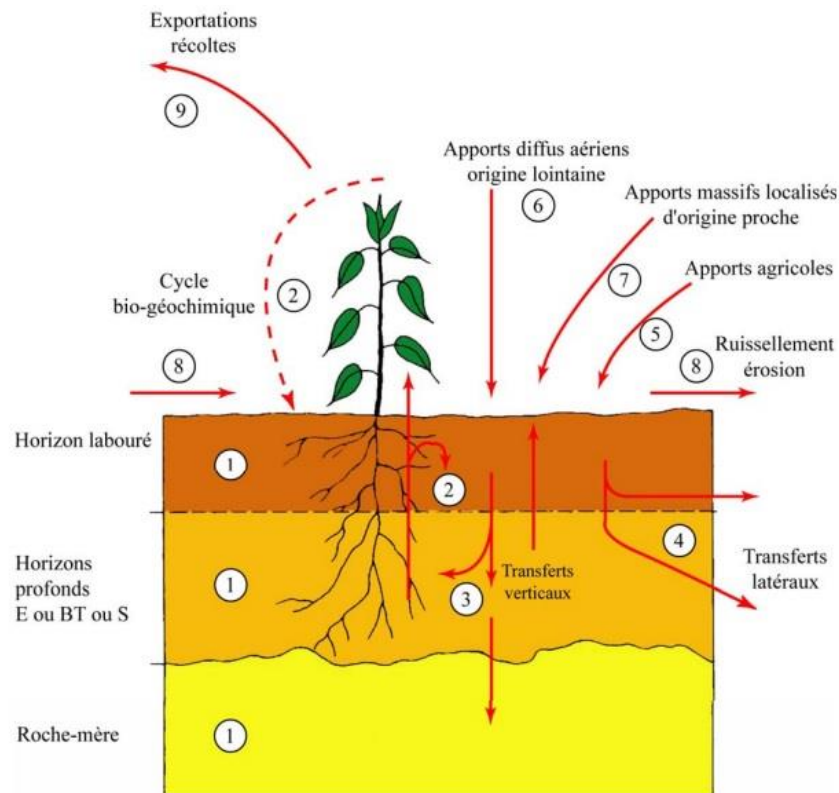


Figure 2 : Schéma de la dispersion des ETs dans l'environnement (Baize 2007).

1.3. Toxicité des éléments traces

Le sol est la partie fondamentale et essentielle des écosystèmes, étant notamment la principale source de nutriments pour les plantes, et indirectement des animaux et des humains. Dans le sol les ETs sont naturellement présents sous une forme relativement peu mobile et à très faible concentration. Les activités anthropiques, en modifiant le niveau naturel, l'équilibre biochimique et le cycle géochimique des ETs dans l'environnement, menacent l'équilibre fragile des écosystèmes. Contrairement aux contaminants organiques, les ETs sont retenus dans les sols pratiquement indéfiniment car ils ne sont pas dégradables. Par conséquent, les sols contaminés par des ETs présentent un risque à long terme d'augmentation de l'absorption par les plantes, de pénétration dans la chaîne alimentaire et

de dissémination dans les eaux de ruissellement et souterraines avec des implications potentiellement négatives pour les écosystèmes, y compris pour la santé humaine.

Pour une majorité d'organismes vivants, plusieurs ETs comme le B, Cu, Mo ou Zn ont des fonctions biologiques reconnues et sont nécessaires à faibles quantités (connus sous les noms de micronutriments ou oligo-éléments) (Nagajyoti *et al.* 2010). Ils sont des constituants de plusieurs enzymes clés et jouent un rôle fondamental dans diverses réactions d'oxydoréduction. En revanche ces mêmes ETs peuvent devenir toxiques à des concentrations excessives (Burnol *et al.* 2006). À l'inverse certains ETs tels que le Cd, Pb ou Hg n'ont aucun rôle biologique et ont des effets délétères à très faible concentration. Ainsi, au-delà d'un certain seuil, tous les ETs impactent négativement les organismes de l'ensemble des écosystèmes par le biais de processus de bioaccumulation et bioamplification (Szynkowska *et al.* 2018). Leur toxicité dépend également de plusieurs facteurs, notamment la concentration, la spéciation physique et chimique, la voie d'exposition, l'état d'oxydation, ainsi que l'individu exposé (l'âge, le sexe, la génétique et l'état nutritionnel) (Tchounwou *et al.* 2012).

Les micro et macrofaune du sol sont des organismes indispensables au bon fonctionnement de celui-ci et sont les premiers exposés à la toxicité des ETs dans le sol entraînant parfois de graves perturbations de l'écosystème. Leur extrême sensibilité aux conditions du sol en fait donc des indicateurs de perturbations des sols. Dans l'ensemble, la toxicité relative des ETs peut être classifiée par ordre décroissant comme suit : Cd > Cu > Zn > Pb (Bååth, 1989), affectant les populations microbiennes ainsi que de nombreux processus métaboliques tels que la diminution de la décomposition de la litière, la minéralisation de l'azote ou une inhibition des activités enzymatiques (Abdu *et al.* 2017). Ces mêmes travaux résumant des résultats de plusieurs études (Bååth, 1989) montrent cependant l'énorme disparité entre les études quant aux concentrations d'ETs toxiques. Toutefois, il a souvent été affirmé que les champignons sont plus tolérants aux ETs en tant que groupe que les bactéries (Rajapaksha *et al.* 2004). Concernant la macrofaune, une étude réalisée dans le nord de la France sur des sols pollués à différents gradients de Zn (171 à 18809 mg kg⁻¹), Cd (0,75 à 20 mg kg⁻¹) et Pb (43 à 6153 mg kg⁻¹), a montré que les polluants à base d'ETs affectent la densité, la diversité et la structure de la communauté de la macrofaune (notamment les vers de terre) (Nahmani & Lavelle 2002). Des tests d'écotoxicité en laboratoire ou d'autres études sur le terrain ont également montré des effets négatifs des ETs sur l'activité alimentaire, la biomasse

et la reproduction des escargots (Kammenga & Laskowski 2000), isopodes (Knigge & Köhler 2000), myriapodes (Grelle *et al.* 2000) et des arachnides (Rabitsch 1995).

La toxicité des ETs chez les plantes se traduit majoritairement par deux types de symptômes : (i) par une perturbation de la nutrition minérale des plantes en entrant en compétition pour l'absorption des nutriments essentiels (Benavides *et al.* 2005; Yruela 2005), et (ii) par une accumulation dans les tissus et les cellules des plantes induisant une perturbation du métabolisme général de la plante (Rout & Das 2003; Hasan *et al.* 2009). En général, les effets toxiques des ETs sont observés au niveau des racines et sont souvent diversifiés (diminution de la biomasse, changement de morphologie, diminution de l'élongation racinaire, diminution de la densité de poils absorbants, subérification ou lignification accrue, épaissement du méristème, brunissement ou apparition de pigments, etc). Par exemple le Pb a un effet important sur les plantes car il peut avoir un impact sur tous les aspects de la croissance et de la santé des plantes, même à une très faible concentration (Perl 2020). Il a été démontré que la production de biomasse des racines et des parties aériennes chez plusieurs espèces (*Helianthus annuus*, *Zea mays*, *Elsholtzia argyi*) pouvait également être réduite de moitié dès 50 μM aussi bien dans le cas de culture en hydroponie que de culture sur sol (Islam *et al.* 2007; Hadi *et al.* 2010; Chauhan *et al.* 2020). En outre, le Pb impacte fortement le métabolisme des plantes en diminuant l'activité photosynthétique, la teneur en protéines, l'absorption des nutriments, le taux de respiration et la teneur en ATP ; ou en augmentant la peroxydation lipidique et le stress oxydatif (Pourrut *et al.* 2011). La production d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) causée par la toxicité du Pb peut conduire à un stress oxydatif, qui est largement identifié comme un indicateur du stress des plantes et peut conduire à la mort cellulaire (Keunen *et al.* 2011; Kumar & Prasad 2018). Autre exemple avec le Cd(II), l'un des ETs les plus toxiques, qui est absorbé par les racines et transféré vers les différents organes, qui modifie le potentiel membranaire, et accélère la production de ROS et la peroxydation des lipides membranaires (Filipič, 2012 ; Takahashi *et al.*, 2012 ; Opendakker *et al.*, 2012). De plus, ces effets entraînent un blocage du cycle cellulaire ou des dommages à l'ADN, réduisant la photosynthèse, l'absorption des nutriments et la fixation du carbone et affectant les paramètres physiologiques de la plante. Ces effets provoquent la chlorose, la nécrose, le rougissement des nervures, la réduction de la croissance, la perte de rendement des cultures et peuvent conduire à la mort des plantes (Monteiro *et al.*, 2012).

Pour faire face à la phytotoxicité des ETs les plantes ont développé des stratégies visant à (i) évacuer ou stocker les ETs sous une forme inactive, ou (ii) ralentir ou empêcher l'entrée d'ions toxiques.

Du point de vue de la santé humaine l'exposition a principalement lieu lors de la consommation d'aliments contaminés. L'As, le Cd, le Hg, le Pb et le Se sont les plus importants ETs du point de vue de la contamination de la chaîne alimentaire (Antoniadis *et al.* 2019). Ils peuvent être à l'origine d'intoxications ou de maladies chroniques graves, même à faibles doses ; par exemple l'absorption de Pb provoque le saturnisme. L'ingestion excessive d'As est principalement due à des concentrations élevées d'As dans l'eau potable, qui ont été associées à un risque accru de cancer de la peau. Le Cd présent dans les sols contaminés est le plus préoccupant en termes d'entrée dans la chaîne alimentaire, car il peut être absorbé par les plantes alimentaires en grandes quantités par rapport à sa concentration dans le sol. En outre, le Cd s'accumule dans l'organisme tout au long de la vie et des données récentes suggèrent que les effets néfastes de cet élément sur la santé (dysfonctionnement rénal, fragilisation osseuse), peuvent se produire à des niveaux d'exposition plus faibles que ce que l'on pensait auparavant ($< 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ journalier) (Hu *et al.* 2016).

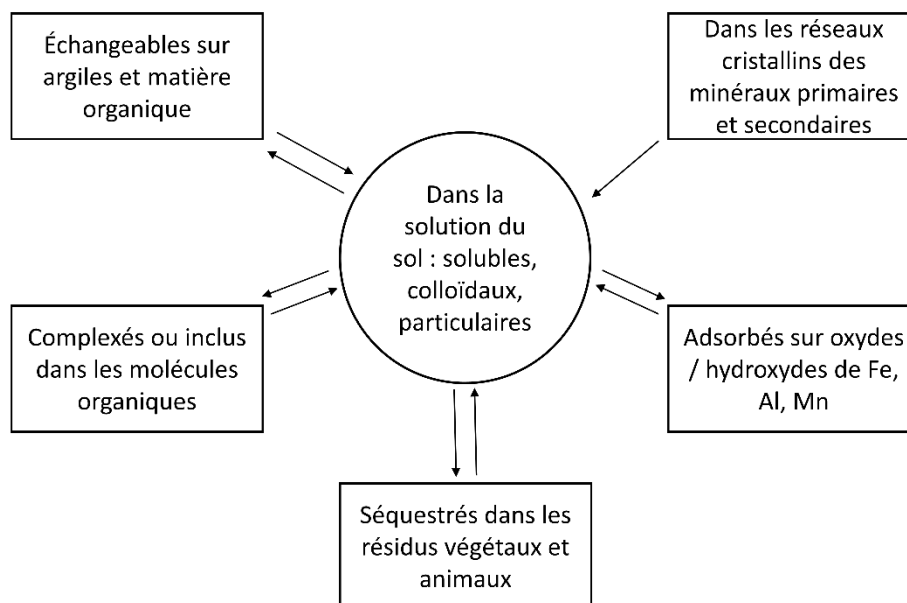
De plus la toxicité des ETs est généralement abordée sous l'angle d'un seul contaminant. Cependant, dans la plupart des cas, différents ETs sont présents dans le sol et les eaux souterraines. En outre, plusieurs ETs peuvent interagir et modifier leur biodisponibilité, en fonction des propriétés du sol et du vieillissement. Par conséquent, les êtres humains et les organismes vivants sont généralement exposés à plus d'un contaminant à la fois et des interrogations quant à la toxicité de tels cocktails se pose.

1.4. Devenir des éléments traces dans le sol

1.4.1. Spéciation et mobilité des ETs dans les sols

La teneur en ET d'un sol ne suffit pas à évaluer le comportement de cet ET, sa mobilité, biodisponibilité et toxicité pour les organismes vivants. C'est la forme sous laquelle se trouve l'ET, c'est-à-dire sa spéciation physique et chimique, qui est déterminante. La spéciation d'un ET se définit par sa distribution entre les diverses espèces physiques et chimiques qu'il peut

arborer dans la phase solide du sol ou dans la phase aqueuse, appelée solution du sol (Hooda 2010). Ces différentes formes des ETs se répartissent entre les phases solide, liquide ou gazeuse du sol et changent de formes continuellement (Baize 2007) (**Figure 3**). Ainsi dans la solution du sol les ETs se retrouvent sous forme : (i) d'ions libres, (ii) de complexes inorganiques, (iii) de complexes organiques ou (iv) liés à des colloïdes en suspension (*e.g.* argiles). Pour la phase solide du sol les ET peuvent être : (i) adsorbés sur des surfaces chargées, (ii) complexés à des molécules organiques, (iii) associés à une structure minérale (coprécipitation de surface, substitution isomorphique) ou (iv) sous une forme métallique (Hooda 2010). Les ETs dans la solution du sol sont considérés comme les plus mobiles, biodisponibles et toxiques. Ces termes sont définis par Baize comme tel : (i) la mobilité est l'aptitude d'un élément à passer d'un compartiment du sol où il est retenu avec une certaine



énergie dans un autre, où il est retenu avec une moindre énergie ; (ii) la biodisponibilité est l'aptitude d'un élément à passer d'un compartiment quelconque du sol dans un être vivant (Baize 1997) .

Figure 3 : Différentes formes et localisation des ETs dans les sols (d'après Baize, 2007).

1.4.2. Facteurs influençant le devenir des éléments traces dans le sol

De multiples facteurs influencent le comportement, la mobilité, la disponibilité et donc le devenir des ETs dans le sol. Il dépend principalement des caractéristiques de celui-ci : la

teneur en matière organique (notamment en substances humiques), le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la capacité d'échange cationique (CEC) ou encore la proportion de la fraction argileuse (Prasad & Hagemeyer 1999; Hooda 2010). Par exemple, une diminution du pH améliore la mobilité des ETs de par la plus forte affinité des ions hydrogènes pour les charges négatives des colloïdes qui entrent en compétition avec les ETs pour ces sites, les libérant dans le milieu (Prasad & Hagemeyer 1999). Dépendamment du contexte, une augmentation de pH peut induire soit une augmentation des concentrations en ETs qui seront associés à des phases colloïdales solubilisées (Pédrot *et al.* 2009) ou une immobilisation des ETs par la formation de composés insolubles. De plus, la dissolution réductrice des oxyhydroxydes de Fe solubilise la MO avec une densité de groupes carboxyliques et phénoliques plus élevée que si la désorption avait lieu en raison de l'augmentation du pH. La MO libérée affecte le transport des ETs car la capacité des molécules organiques à complexer les ETs est positivement corrélée à la densité des groupements carboxyliques et phénoliques (Pédrot *et al.* 2009; Grybos *et al.* 2009).

La matière organique du sol influence également la biodisponibilité des ETs mais ses effets sont complexes et les résultats divergent en fonction des études. Cela est associé à la diversité des groupements fonctionnels et de la nature chimique des ETs, ayant chacun des affinités différentes (constante d'absorption, affinités). Par exemple, le Cd peut s'adsorber sur les groupes hydroxyle, carboxylique, phosphoryle, et phénolique présents dans la matière organique, réduisant ainsi sa biodisponibilité.

Ainsi, les variations de ces conditions ainsi que la concentration en ETs du milieu gouvernent les multiples réactions d'adsorption/désorption, de précipitation/dissolution, d'oxydation/réduction qui contrôlent le devenir des ETs.

Les microorganismes du sol peuvent aussi intervenir directement ou indirectement sur leur spéciation, notamment sur leur degré d'oxydation ou d'alkylation, ce qui peut conduire à une modification de leur biodisponibilité (Bourrelier *et al.* 1998). Certains microorganismes entraînent la dissolution de silicates, phosphates, oxydes, sulfures et carbonates porteurs d'ETs en produisant des acides dans le milieu. Ils peuvent également modifier les conditions du milieu par acidification, alcalinisation et changement des conditions d'oxydo-réduction. Au

contraire, d'autres processus microbiens peuvent entraîner l'insolubilisation des ETs par précipitation ou par formation de sulfures métalliques insolubles dans un processus entraînant la réduction de sulfates (Bourrelier *et al.* 1998).

1.4.3. Les effets de la plante sur la spéciation et la mobilité des éléments traces

La biodisponibilité est définie officiellement comme « le degré avec lequel les contaminants chimiques présents dans un sol peuvent être absorbés ou métabolisés par un humain ou un récepteur écologique ou sont disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques » (ISO/DIS 11074). Pour le système sol-plante, la biodisponibilité d'un élément peut être définie comme son aptitude à être prélevé par les racines des plantes (Juste 1988).

Les interactions entre les ETs et les plantes ont principalement lieu au niveau de l'interface sol-racines, aussi nommée rhizosphère. Ainsi, l'activité racinaire modifie les paramètres physico-chimiques du sol dans la rhizosphère et, par conséquent, la spéciation des ETs (Hinsinger 2001). Parmi ces différents processus on retrouve notamment :

- Le changement du pH : le prélèvement des nutriments par les racines peut modifier le pH du sol dans la rhizosphère, du fait de l'activité d'échange racinaire. Les plantes peuvent ainsi acidifier le milieu en excréant un excès de charges positives sous forme de protons, ou inversement l'alcaliniser en relâchant des ions hydroxydes ou bicarbonates (Hinsinger 2001). En modifiant le pH de la rhizosphère, les plantes peuvent très diversement affecter la spéciation et la biodisponibilité des éléments traces, promouvoir la dissolution de certains minéraux comme les carbonates, oxydes, phosphates, silicates et libérer ainsi les ETs contenus dans ces minéraux.
- Le changement des conditions redox : les systèmes enzymatiques de type réductase au niveau des membranes des cellules racinaires ainsi que la consommation d'oxygène par les racines contribuent à modifier le potentiel redox dans le voisinage immédiat de la surface des racines (Flessa & Fischer 1992). Ces changements des conditions redox favorisent par exemple la dissolution des oxydes de Fe et de Mn riches en ETs, et peuvent modifier le degré d'oxydation de l'ET.
- Les exsudats racinaires : ce sont des molécules excrétées par les plantes afin d'améliorer les contacts sol-racine, protéger certaines zones apicales racinaires ou bien prélever des nutriments du sol. Ces molécules varient selon la nature des espèces

végétales et les conditions de croissance de la plante (Van Dam & Bouwmeester 2016). Les polysaccharides, les acides organiques, les phénols et les acides aminés représentent l'essentiel des exsudats de faible masse moléculaire (Van Dam & Bouwmeester 2016). Les exsudats de haut poids moléculaire sont représentés par le groupe des phytosidérophores. Ils ont la capacité de former les complexes solubles avec les métaux tels que Fe, Mn, Cu, Zn et Pb, accroissant ainsi leur mobilité dans la rhizosphère (Mench *et al.* 1988). Les acides organiques de faible poids moléculaire fonctionnent comme des chélateurs d'ETs et sont sécrétés par les plantes comme mécanisme d'exclusion empêchant les ions métalliques de pénétrer dans les cellules racinaires (Chen *et al.* 2017). Parmi les ligands organiques simples, le citrate, l'oxalate et le malate présentent de fortes affinités pour les métaux tels que Cu, Zn et Pb (Mench *et al.* 1988; Hinsinger 2001).

1.4.4. Prélèvement et accumulation des éléments traces par les plantes

Après avoir été solubilisés, les ETs peuvent être capturés par le système racinaire des plantes. Les mécanismes de prélèvement et d'accumulation d'ETs dans les plantes peuvent intervenir à différents niveaux depuis l'absorption par les racines jusqu'à l'accumulation dans les feuilles.

Certains ETs sont plus mobiles et disponibles pour l'absorption par les plantes (Cd ou Zn) que d'autres (Pb) qui sont relativement immobiles (Lasat *et al.* 1998). Dans l'ensemble, il n'y a pas de corrélation entre la teneur en ETs du sol et la teneur en ETs des plantes car leur biodisponibilité dépend majoritairement de leur spéciation physique et chimique dans le sol. Toutefois, les ETs doivent être présents en solution pour être absorbés par les racines. On estime ainsi que la majorité des prélèvements d'ETs se fait sous des formes ioniques (Lasat *et al.* 1998). Dans le cas de certains ETs tels que Zn, Cu et Pb, des formes complexées par des ligands organiques semblent intervenir dans le prélèvement (*e.g.* Pb-EDTA) (Sarret *et al.* 2001).

L'absorption d'ETs par les racines se fait soit par diffusion passive à travers la membrane cellulaire, soit par le processus de transport actif contre des gradients de concentration et/ou de potentiel électrochimique médiés par des transporteurs, via des

molécules solubles liant les ETs et des protéines qui transportent les ETs entre les différents transporteurs (González-Guerrero *et al.* 2016; Yang *et al.* 2022). À ce jour, il a été décrit 313 transporteurs de métaux répartis dans 17 familles, identifiés pour l'absorption et le transport des ETs dans les plantes (Yang *et al.* 2022). Certains transporteurs sont spécifiques à un ET, tel est le cas de COPT5 pour le cuivre. Les ions peuvent aussi se retrouver en compétition pour le même transporteur d'absorption de nutriment essentiel en se liant à des motifs régulateurs au sein de la protéine (Lešková *et al.* 2022). Tel est le cas du transporteur du Fe IRT1 capable de transporter un large éventail d'ions métalliques divalents (Korshunova *et al.* 1999). De plus, des phénomènes de chélation peut avoir lieu entre les ETs dans le milieu et des peptides avant d'être absorbés dans la plante par des transporteurs spécifiques (tel est le cas de l'arsenic qui peut être pris en charge par des phytochélatines). L'activité de transport dépendra donc des affinités respectives des transporteurs pour ces différents ETs, ainsi que de la teneur en ETs respective dans les différents compartiments cellulaires. Par conséquent, un changement marqué dans l'apport en ions dans le milieu peut entraîner des accumulations potentiellement toxiques en l'ET de substitution dans les plantes. Dans le cas d'une carence en Fe, la libération de phytosidérophores peut altérer la disponibilité en ETs comme le Zn, Cu ou Ni (Lešková *et al.* 2022). Une interaction compétitive entre les ETs pour les ligands comme les phytosidérophores peut alors être observée, tel est le cas du complexe Zn-phytosidérophores qui est plus stable que Fe-phytosidérophore sécrété par le riz cultivé dans les sols inondés pauvres en Fe (Murakami *et al.* 1989). Ainsi, les ETs essentiels et même toxiques mobilisés par les phytosidérophores libérés en réponse à une carence en Fe peuvent éventuellement pénétrer également dans la plante. En plus de la compétition entre les substrats transportés, un ET essentiel spécifique peut interférer avec l'absorption d'autres nutriments en modifiant l'activité des protéines transporteuses, influant sur le métabolisme ROS, modulant l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition de nutriments non métalliques, ou en induisant des changements dans la forme et la morphologie des systèmes racinaires (Lešková *et al.* 2022).

Les ETs sont ensuite transférés aux vaisseaux du xylème par voie apoplasmique ou symplasmique où ils cheminent de cellule en cellule via le réseau de plasmodesmes. Ils traversent ensuite la membrane plasmique d'une cellule à l'aide de protéines transporteuses ou par complexation ou échange cationique avec les groupements fonctionnels (carboxyles,

hydroxyles, phosphoryles, amines, etc) de la paroi (Yang *et al.* 2022). Cependant, une majorité des ETs sous forme ionique sont immobilisés dans les compartiments apoplastiques et symplastiques après avoir formé des précipités de carbonate, de sulfate ou de phosphate (Garbisu & Alkorta 2001). Ainsi, l'entrée des ETs de la racine dans le xylème est principalement déterminée par trois processus : la séquestration des ions métalliques dans les cellules de la racine, le transport symplasmique dans la stèle et la libération dans le xylème (Ghosh & Singh 2005). Une fois arrivés dans les organes aériens via la sève brute les ETs sont alors le plus souvent absorbés dans le symplaste par des transporteurs (Marschner 1995), puis distribués dans les feuilles via l'apoplaste ou le symplaste (Karley *et al.* 2000). Les ETs non essentiels ou en excès sont transportés du cytoplasme vers des vésicules ou des vacuoles des cellules foliaires (Yang *et al.* 2022). Ceux-ci peuvent aussi être partiellement évaporés dans l'atmosphère par transpiration dans le cas des éléments volatils (Clemens *et al.* 2002). Dans le cas du tournesol les ETs peuvent être stockés spécifiquement dans des organes distincts. On trouve notamment une accumulation du Cd dans les graines ou du Zn dans les trichomes des feuilles (Li *et al.* 2021).

Pour pallier à l'impact de l'accumulation des ETs dans leurs organes, les plantes ont mis en place des mécanismes de tolérance et de détoxification. D'une part, la résistance au stress causé par les ETs peut être obtenue par « évitement » lorsque les plantes sont capables de restreindre l'absorption des ETs, ou par « tolérance » lorsque les plantes survivent en présence d'une concentration interne élevée d'ETs (Hossain *et al.* 2012). L'accumulation et la séquestration dans les différentes parties de la plante (*p.ex.* vacuoles) comme vu précédemment sont aussi partie intégrante des mécanismes de tolérance. Les ETs peuvent également être chélatés de manière intracellulaire via la synthèse d'acides aminés, d'acides organiques, de glutathion ou de ligands se liant aux ETs tels que les métallothionéines (MT), les phytochélatines (PC) (Hossain *et al.* 2009). Ensuite, l'exposition aux ETs entraînant la production de ROS, les cellules sont équipées de mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques pour contrer ces dommages. Les piègeurs enzymatiques de ROS comprennent les superoxyde dismutases (SOD), les catalases, les glutathion réductases et les peroxydases, entre autres, tandis que les principaux antioxydants non enzymatiques sont le glutathion, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, les flavonoïdes, les anthocyanes, les caroténoïdes et les acides organiques (Sytar *et al.* 2013). Parmi les principaux antioxydants enzymatiques, la SOD

constitue la première ligne de défense contre les ROS accrus par le stress abiotique (Saibi & Brini 2018). Ces métalloprotéines catalysent la dismutation des anions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en oxygène O_2 et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La réponse de la SOD au stress ETs varie considérablement en fonction de l'espèce végétale, du stade de développement, du métal utilisé dans l'expérience et de la durée d'exposition (Saibi & Brini 2018). Tel est par exemple le cas pour un stress au Cd où dans un cas l'activité SOD augmente de façon croissante avec l'augmentation des doses de Cd dans le sol (25 à 100 mg kg⁻¹) chez le haricot mungo (Anjum *et al.* 2011) ou inversement, diminue chez *Arabidopsis thaliana* (300 à 500 µM) (Cho & Seo 2005). De plus, lorsque les niveaux de ROS dépassent la capacité de la plante à les éliminer, la peroxydation des lipides augmente dans les membranes biologiques, ce qui a un impact sur les processus physiologiques de la cellule. Les espèces réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS), y compris le malondialdéhyde (MDA), qui est l'un des principaux produits finaux de la modification oxydative des lipides, sont couramment utilisées comme indicateurs de la peroxydation des lipides. Le MDA est également responsable des lésions de la membrane cellulaire résultant de la décomposition des peroxydes lipidiques, qui sont très réactifs et instables. Les dommages causés à la membrane cellulaire comprennent des changements dans les propriétés intrinsèques de la membrane, telles que la fluidité de la membrane, le transport des ions, la perte d'activité enzymatique et la réticulation des protéines (Labudda 2013).

2. Remédiation des sols pollués par les éléments traces

2.1. Généralités

La gestion des sols pollués sur le moyen et long terme est primordiale car, comme l'eau, les sols sont une ressource limitée et indispensable. Ainsi, dans le but d'engager une politique de traitement des sites et sols pollués, le Ministère de l'Environnement a mis au point des outils de recensement des sites pollués sur le territoire français au début des années quatre-vingt-dix et une définition d'un site pollué est établie comme « un site dont le sol, le sous-sol, ou les eaux souterraines ont été pollués par d'anciens dépôts de déchets ou par l'infiltration de substance polluante, cette pollution étant susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou pour l'environnement » (Ministère de l'Environnement, 1994). En 2018 plus de 6 800 sites et sols pollués ont été recensés en France dont près de 50 % par au moins un ET (Colombano *et al.*, 2014; Commissariat général au

développement durable 2019). Selon l'Agence Européenne de l'Environnement, le nombre de sites sur lesquels des activités polluantes ont eu lieu par le passé en Europe était estimé à 3 millions en 2006. Des normes fixant les teneurs limites en ETs dans les sols ont été définies dans divers pays (Allemagne, Pays Bas, Suisse, Canada, etc.). En revanche, il n'existe pas à ce jour, de normes en France qui fixent une valeur seuil définissant à partir de quelle teneur un sol est considéré comme pollué. Seule une réglementation partielle existe : le décret n°97-113 du 8 décembre 1997 accompagné de l'arrêté du 8 janvier 1998 fixent les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues issues du traitement des eaux usées sur les sols agricoles. L'arrêté du 8 janvier 1998 stipule notamment les teneurs maximales autorisées en métaux dans les boues et dans les sols susceptibles d'accueillir ces boues (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Teneurs limites en éléments métalliques dans les boues et dans les sols susceptibles de recevoir ces boues, selon l'arrêté du 8 janvier 1998 (J.O. n°26 du 31 janvier 1998).

	Valeur limite dans les boues (mg/kg MS)	Valeur limite dans les sols (mg/kg MS)
Cd	10	2
Cr	1000	150
Cu	1000	100
Hg	10	1
Ni	200	50
Pb	800	100
Zn	3000	300

De nombreuses méthodes et stratégies ont été adoptées pour résoudre le problème de la contamination des sols. Chaque site étant spécifique, le choix de la méthode de dépollution des sols la plus appropriée dépend des caractéristiques du sol (nature du sol, profondeur de la nappe phréatique) et du site (accessibilité, nature et type d'activité pratiquée sur le site, présence de structures ou de réseaux enterrés), du polluant à éliminer (nature, concentration, toxicité) et de l'utilisation finale du milieu contaminé (Mulligan *et al.* 2001). La prise en compte de ces divers paramètres permettra de définir les objectifs de concentrations résiduelles à atteindre et dans quels délais. Il faut également considérer le critère économique puisque le coût est variable en fonction de la technique choisie, les critères environnementaux

avec l'utilisation d'un procédé destructif du sol ou non, ou encore l'impact du procédé sur les fonctionnalités du sol (Colombano *et al.* 2014).

En général, les techniques de remédiation peuvent être classées en deux stratégies principales : les techniques *in situ* qui consiste à traiter le polluant à son emplacement d'origine et les méthodes *ex situ* qui implique l'excavation et l'enlèvement du sol pollué pour le traiter ailleurs. Comparée à la dépollution *ex situ*, la dépollution *in situ* offre un certain nombre d'avantages techniques, économiques, sanitaires et environnementaux potentiels (Song *et al.* 2017).

Parmi les différents procédés de dépollution, on retrouve les techniques physiques, thermiques, chimiques et biologiques. Elles peuvent être définies de manière générale comme suit (Colombano *et al.* 2010):

- Les procédés physiques consistent à utiliser des fluides (eau ou gaz), injectés ou présents dans le sol, comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser.
- Les procédés thermiques utilisent la chaleur pour détruire le polluant (ex : incinération), l'isoler (désorption thermique, thermolyse, etc.) ou le rendre inerte (vitrification, etc.).
- Les procédés chimiques utilisent les propriétés chimiques des polluants pour les rendre inertes (précipitation, etc.), les détruire (oxydation, etc.) ou les séparer du milieu pollué (surfactants, etc.).
- Les procédés biologiques consistent à utiliser des microorganismes, le plus souvent des bactéries ou des végétaux afin de favoriser la dégradation totale ou partielle des polluants. Certains bioprocédés permettent aussi de fixer ou de solubiliser certains polluants.

En France, en 2012, la quantité de terres polluées traitées ou engagées dans un traitement est estimée à environ 8 millions de tonnes (Ernst & Young 2012). L'examen des taux d'utilisation des techniques de gestion des sols pollués de 2010 montre que 65 % du tonnage est géré *in situ* (Ernst & Young 2012). En prenant en considération uniquement les techniques de dépollutions, les procédés biologiques représentent la voie principale devant les procédés

physiques et chimiques. En 2010, près de 80 % des terres traitées (en tonnage) ont été dépolluées par des techniques biologiques (Ernst & Young 2012).

2.2. La phytoremédiation

La phytoremédiation est une technique biologique de réhabilitation environnementale qui utilise les capacités des plantes pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les polluants. Cette technique peut être appliquée aussi bien pour des ETs, que pour des polluants organiques ou radioéléments présents dans le sol ou dans l'eau (Raskin *et al.* 1997; Krämer 2005). Ce processus tire parti de la capacité des plantes à absorber, accumuler et/ou dégrader les constituants présents dans les sols et les eaux (Khan *et al.* 2004). En effet, toutes les plantes extraient de ces environnements les composants nécessaires à leur croissance, y compris les nutriments et les ETs. De plus, au cours de l'évolution, les plantes ont développé des mécanismes pour s'adapter et croître dans des conditions hostiles. Certaines d'entre elles ont adopté des mécanismes racinaires permettant d'immobiliser les ETs au niveau des racines et de diminuer leur transfert vers les feuilles où ils seraient toxiques. A l'inverse d'autres plantes ont acquis des processus complexes pour tolérer, absorber et accumuler dans leurs tissus des quantités significatives d'ETs.

2.2.1. Les différents procédés

La phytoremédiation regroupe plusieurs stratégies ayant pour objectif soit de réduire la teneur des contaminants dans le milieu où ils sont présents, soit de réduire leur mobilité (**Figure 4**).

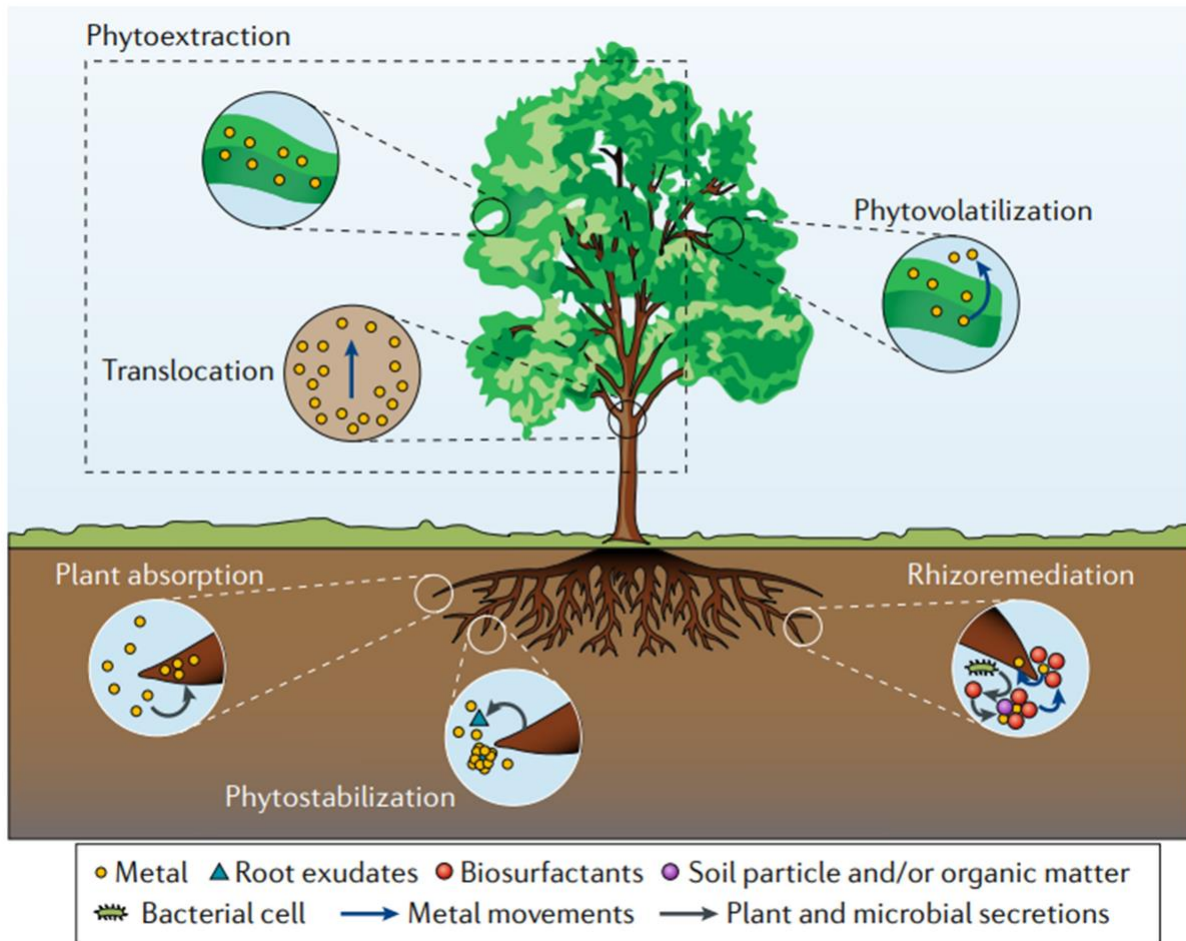


Figure 4 : Les différentes stratégies de phytoremédiation (Hou *et al.* 2020).

- La phytoextraction :

Parmi ces différentes méthodes la phytoextraction est considérée comme la plus importante et la plus couramment utilisée. L'objectif de la phytoextraction est de maximiser le rendement de la biomasse ainsi que la concentration des ETs dans les plantes par le transfert des ETs depuis le sol vers les tissus végétaux en utilisant leurs propriétés accumulatrices (Wang *et al.* 2020). Les parties aériennes peuvent ensuite être récoltées, puis les métaux sont concentrés par des traitements thermiques, chimiques ou microbiologiques.

Pour que cette méthode de dépollution soit réalisable, les plantes doivent (1) extraire de grandes concentrations d'ETs dans leurs racines, (2) transloquer les ETs dans la biomasse de surface, et (3) produire une grande quantité de biomasse végétale (Arthur *et al.* 2005). En outre, les plantes de remédiation doivent disposer de mécanismes permettant de détoxifier et/ou tolérer les fortes concentrations d'ETs accumulées dans leurs pousses (Brennan & Shelley 1999).

En outre, certaines plantes sont naturellement capables d'accumuler de fortes teneurs en ETs : ce sont des plantes dites « accumulatrices ». Les teneurs accumulées dans leurs tissus doivent être supérieures à celles présentes dans le sol. Certaines sont dites « hyperaccumulatrices », si elles sont capables d'accumuler plus de 10000 mg.kg⁻¹ de Mn, Ni ou Zn, plus de 1000 mg.kg⁻¹ de Cu, Co, Pb, Cr, ou plus de 50 mg.kg⁻¹ de Cd dans leurs feuilles (Krämer 2010). La plupart des plantes hyperaccumulatrices sont de petites tailles et ont une croissance lente, produisant ainsi une faible biomasse. D'autres plantes sont seulement tolérantes et ne peuvent accumuler que des teneurs relativement faibles en ETs dans leurs tissus, mais produisent une biomasse plus importante. Ainsi deux méthodes se développent parallèlement : la phytoextraction par les plantes hyperaccumulatrices et la phytoextraction par des plantes tolérantes à forte biomasse (*e.g. Brassica spp., Zea mays, Helianthus annuus, Hordeum vulgare, Avena sativa, Populus spp., Salix spp.*). Cette dernière technique de phytoextraction peut également être assistée par l'ajout d'amendement dans les sols afin d'augmenter la solubilité des ETs dans les sols.

- La phytostabilisation :

Cette méthode consiste à utiliser certaines espèces végétales dans le but d'immobiliser les contaminants *in situ* dans le sol et les eaux souterraines par absorption et accumulation par les racines, adsorption sur les racines, ou précipitation dans la rhizosphère (Etim 2012). Ce processus réduit la mobilité du contaminant et empêche sa migration vers les eaux souterraines, tout en réduisant la biodisponibilité et le transfert de l'ET dans la chaîne alimentaire. La phytostabilisation peut également être utilisée pour rétablir le couvert végétal sur des sites où la végétation naturelle ne survit pas en raison des fortes concentrations en ETs dans les sols de surface. Dans ce cas, des espèces tolérantes aux ETs sont utilisées pour restaurer la végétation sur les sites contaminés, réduisant ainsi le déplacement potentiel des polluants par l'érosion éolienne et le transport de particules et contaminants par ruissellement de surface et la lixiviation de la contamination du sol vers les eaux souterraines. La phytostabilisation peut se produire par un mécanisme de sorption, précipitation, complexation ou oxydoréduction de l'ETs. Elle est utile notamment pour le traitement du Pb, As, Cd, Cr, Cu, ou encore du Zn (Dary *et al.* 2010). La phytostabilisation tire parti des changements que la présence de la plante induit dans la chimie du sol et dans l'environnement, permettant ainsi de faciliter l'immobilisation des contaminants.

- La phytovolatilisation :

La phytovolatilisation consiste en l'utilisation de végétaux pour extraire certains ETs ou contaminants organiques présents dans le sol, les sédiments ou l'eau et de libérer le polluant ou ses métabolites dans l'atmosphère sous formes volatiles (USEPA 2000). Cette volatilisation a lieu dans les feuilles de certains végétaux par évapotranspiration (Gerhardt *et al.* 2009). Elle peut également impliquer la diffusion de contaminants à partir des tiges ou d'autres parties de la plante que le contaminant traverse avant d'atteindre les feuilles (Raskin & Ensley 2000). Ce procédé comporte cependant peu d'intérêt dans la gestion des sites contaminés puisque cela ne résout pas le problème de pollution environnementale mais déplace la contamination du sol vers l'atmosphère.

- La phytodégradation :

Ce procédé utilise les plantes et les microorganismes associés pour transformer au niveau de la rhizosphère les polluants organiques toxiques en substances moins toxiques. Cette technique se rapproche plus de la bioremédiation assistée par les plantes puisqu'elle repose sur l'action des microorganismes rhizosphériques (Srivastav *et al.* 2018).

2.2.2. Les avantages

La phytoremédiation ainsi que la bioremédiation de manière générale présentent de nombreux avantages en termes de durabilité, notamment une réduction des coûts, ce qui en fait une solution adaptée à la réhabilitation de sites pollués sur de grandes superficies (Khan *et al.* 2004). De plus, elles apportent une sécurité accrue pour les travailleurs et une empreinte environnementale plus faible sur l'ensemble du cycle de vie par rapport aux méthodes d'assainissement traditionnelles (Hou *et al.* 2018), ce qui maximise les avantages économiques, sociaux et environnementaux de l'assainissement des sols (Hou *et al.* 2020).

Cette méthode se pratique *in situ*, permettant de limiter le risque de dispersion des contaminants contrairement aux techniques classiques d'excavations. Elle est par ailleurs adaptée à une large gamme de contaminants tels que les ETs, les hydrocarbures, les pesticides organophosphorés ou encore les explosifs (Khan *et al.* 2004). La phytoremédiation tend également à être plus durable que les techniques thermiques ou physico-chimiques

traditionnelles, tel que le lavage du sol, qui peuvent éliminer ou détruire les organismes vivants et la matière organique du sol, compromettant ainsi la santé du sol à long terme et diminuant la productivité du sol après la réhabilitation (Hou *et al.* 2018). C'est une technique « passive » permettant l'apport de matière organique, de nutriments et d'oxygène dans le sol *via* les processus métaboliques des végétaux et des microorganismes rhizosphériques, ce qui permet d'améliorer la qualité globale du sol mais également sa biodiversité et sa structure (Gerhardt *et al.* 2009).

Enfin, les méthodes de phytoremédiation peuvent être déployées dans n'importe quelle zone géographique à conditions que les plantes sélectionnées puissent s'y développer. C'est une technique jugée comme « esthétique », n'entraînant pas de pollution visuelle, qui est seulement alimentée par l'énergie solaire et est très bien acceptée par le public (Khan *et al.* 2004; Gerhardt *et al.* 2009). La biomasse produite peut dans certains cas être valorisée comme source de complexes métalliques pour la synthèse chimique ou encore dans le domaine des énergies renouvelables (Escande *et al.* 2015; Cristaldi *et al.* 2017).

2.2.3. Les limites

Ces dernières années, la phytoremédiation a fait des progrès considérables en termes d'acceptation par le marché. Les premières recherches indiquent que la technologie de la phytoremédiation est une solution d'assainissement prometteuse pour une grande variété de sites contaminés par des ETs, bien qu'elle ait ses limites.

Un premier frein majeur à l'affirmation de la phytoremédiation comme technologie de dépollution est la durée de traitement. En effet, la phytoremédiation est une technique biologique qui nécessite un temps de traitement long et plusieurs années, voire dizaines d'années, sont bien souvent requises pour réduire les teneurs en ETs d'un site jusqu'à un niveau acceptable (Blaylock & Huang 2000). Salt *et al.* (1995) estiment que l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices naturelles nécessiterait une quinzaine d'années pour dépolluer un site. Chaque site étant différent, la durée effective de traitement de dépollution par phytoextraction est donc contexte-dépendante. Les temps de traitement dépendent donc des caractéristiques du sol, de la nature des ETs considérés, du niveau de la pollution, ainsi que des espèces végétales utilisées. En outre, l'efficacité phytoremédiatrice de la plupart des hyperaccumulateurs d'ETs est généralement limitée par leur taux de croissance lent et leur faible biomasse (Ali *et al.* 2013). Aussi, l'utilisation de la phytoremédiation est limitée par les

conditions pédoclimatiques et géologiques, la température, l'altitude, le type de sol et l'accessibilité du matériel agricole (Schmöger *et al.* 2000).

Les contaminants peuvent s'accumuler dans le bois de chauffage ou dans les feuilles, entraînant la possibilité qu'ils soient à nouveau libérés dans l'environnement lors de la chute de la litière. La formation de la végétation peut ainsi être limitée par des extrêmes de toxicité environnementale (Schmöger *et al.* 2000). L'utilisation de la phytoremédiation peut également présenter un risque lié à l'entrée des polluants dans la chaîne alimentaire *via* la consommation des végétaux contaminés par les animaux (Singh *et al.* 2003).

De plus, la dépollution par des plantes, comme toute autre méthode biologique, ne permet pas d'éliminer ou réduire la pollution à 100 % car seule la fraction biodisponible des ETs peut être prélevée par les plantes. Ainsi, les plantes ne peuvent extraire qu'une quantité limitée de polluants (Ali *et al.* 2013). D'autre part, l'action de la plante est généralement limitée au sol de surface, voire au sol rhizosphérique (Khan *et al.* 2004). Il est donc préférable de choisir une espèce végétale possédant un réseau racinaire dense et dont la profondeur du développement est adaptée au profil de contamination. Cette méthode semble également peu applicable aux sites fortement pollués car des teneurs élevées en ETs peuvent entraîner un stress abiotique conséquent par la plante et ainsi inhiber son développement aérien mais aussi racinaire, limitant par la même l'efficacité de la phytoremédiation (Padmavathiamma & Li 2007). Une autre limite de la phytoextraction peut être due au fait que l'accumulation d'un ET par la plante peut être inhibée lorsque le sol est multicontaminé aux ETs. Par exemple, *Berkheya coddii*, une plante hyperaccumulatrice du nickel, accumule cinq fois moins de Ni lorsque le milieu de culture contient à la fois Ni et Co (Keeling *et al.* 2003).

3. Les nanoparticules d'oxyde de fer : une nouvelle technologie au service de la phytoremédiation

Ainsi, comme vu dans le paragraphe précédent, la phytoremédiation est une méthode efficace, respectueuse de l'environnement avec une bonne acceptation des citoyens pour traiter les sols contaminés. Cependant, diverses contraintes et inconvénients subsistent encore et freinent sa pérennisation. De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'améliorer l'efficacité de la phytoremédiation par diverses approches. Les nanotechnologies ont récemment offert une nouvelle génération de technologies d'assainissement de l'environnement qui peuvent fournir des solutions rentables à certains des problèmes d'assainissement de l'environnement les plus difficiles à résoudre.

3.1. Les nanoparticules d'oxydes de fer : généralités

3.1.1. Définition et contexte

La Commission européenne a publié une nouvelle recommandation du 10 juin 2022 sur la définition des nanomatériaux (222/C 229/01) comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, constitué de particules solides qui sont présentes soit individuellement soit en tant que particules constitutives identifiables dans des agrégats ou des agglomérats, 50 % au moins de ces particules, dans la répartition numérique par taille, répondant au moins à l'une des conditions suivantes : (a) une ou plusieurs dimensions externes de la particule se situent dans la fourchette de 1 nm à 100 nm ; (b) la particule présente une forme allongée, telle que celle d'un bâtonnet, une fibre ou un tube, où deux dimensions externes sont inférieures à 1 nm et l'autre dimension est supérieure à 100 nm ; (c) la particule présente une forme de plaque, une dimension externe étant inférieure à 1 nm et les autres dimensions sont supérieures à 100 nm ». Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des propriétés ou des comportements particuliers. En raison des nombreuses applications innovantes que laissent entrevoir ces propriétés physiques, chimiques ou biologiques, les nanomatériaux représentent un domaine de la recherche scientifique et technique en pleine expansion. Ainsi, en 2018, 280 234 t de substances à l'état nanoparticulaires ont été produites en France et 107 652 t ont été importées (Direction générale de la prévention des risques, 2019). Il est possible de dénombrer environ 300 catégories de substances à l'état nanoparticulaire. On les retrouve ainsi dans des secteurs

aussi variés que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'énergie ou la santé (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Cinq premiers secteurs d'activités utilisant des NPs en France en 2018 (Direction générale de la prévention des risques 2019).

<i>Secteur d'activité</i>	<i>Quantité produite (t)</i>
Fabrication de produits minéraux non métalliques	300 000
Fabrication de produits chimiques de base, de produits azotés et d'engrais, de matières plastiques de base et de caoutchouc synthétique	109 961
Industrie chimique	102 605
Fabrication d'autres produits chimique inorganiques de base	22 055
Fabrication de colorants et de pigments	15 117
<i>Secteur d'activité</i>	<i>Quantité importée (t)</i>
Industrie chimique	65 080
Fabrication et rechapage de pneumatiques	15 908
Commerce de gros produits chimiques	6 024
Activités des sièges sociaux	3 244
Fabrication de matières plastiques de base	2 082

Il conviendra de distinguer les NPs synthétisées par l'Homme intentionnellement à des fins industrielles, dites « manufacturées », des NPs naturelles issues par exemple de l'érosion des roches ou de l'activité volcanique et des NPs accidentelles qui sont, elles, produites involontairement par les activités humaines. Selon leur composition, les NPs manufacturées sont répertoriées en 3 catégories : (i) les NPs organiques (fullerènes ou « noir de carbone »), (ii) les NPs métalliques (*e.g.* Ag, Au, Fe) et (iii) les NPs d'oxydes métalliques (Fe_3O_4 , TiO_2 , ZnO ou CuO). C'est parmi ce dernier groupe que se classent les NPs d'oxydes de fer (NPs-OxFe).

De par leurs propriétés, les NPs sont employées dans divers secteurs (**Figure 5**) :

- En raison de leurs fortes propriétés magnétiques, certains NPs-OxFe ont d'abord été utilisées en biologie, puis en médecine, pour la séparation magnétique de produits biologiques et de cellules, comme agent de contraste IRM, ainsi que pour l'administration contrôlée de médicaments, en thérapie cellulaire ou encore pour le traitement des cellules cancéreuses (Gupta & Gupta 2005; Laurent *et al.* 2008; Estelrich *et al.* 2015).
- Les NPs-OxFe ont été exploitées dans un large éventail d'applications industrielles et technologiques en raison de leurs caractéristiques conductrices, thermiques et magnétiques. On les retrouve en tant que colorant (e.g. additifs alimentaires E172), dans l'enregistrement et stockage de données, les nanorevêtements, le stockage d'énergie pour piles et batteries, comme catalyseurs de réaction chimique ou encore le développement des énergies renouvelables (Wang *et al.* 2010; Tartaj *et al.* 2011). L'utilisation de la magnétite dans les ferrofluides a été proposée à l'origine pour les joints à haute performance dans les applications spatiales (Teja & Koh 2009).
- Les opportunités de développement des nanotechnologies en agriculture sont aussi nombreuses. Les NPs augmenteraient l'efficacité des intrants grâce à des mécanismes de livraison plus efficaces, réduisant la quantité en substances chimiques appliquées sur les sols (Khot *et al.* 2012). Ils favoriseraient la résistance des plantes aux maladies grâce à la libération contrôlée de micronutriments ou d'antibiotiques et pourraient améliorer l'efficacité de l'utilisation de l'eau en améliorant la rétention d'eau dans les cultures et ainsi minimiser les pertes de récoltes liées au stress hydrique (Smith & Gilbertson 2018; Kah *et al.* 2019; Lowry *et al.* 2019). La petite taille de ces nanomatériaux leur permet de traverser les barrières biologiques, en diffusant dans le système vasculaire des plantes après des applications foliaires, ce qui permet d'ouvrir de nouvelles voies efficaces d'administration de nutriments, de biocides ou produits phytopharmaceutiques.
- Enfin, les NPs-OxFe utilisées à des fins environnementales ont montré des résultats prometteurs dans l'élimination des polluants ou l'atténuation de leur toxicité (Tang & Lo 2013; Rafeeq *et al.* 2022). Les NPs telles que les NPs de magnétite et de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sont couramment utilisées pour le traitement des eaux polluées aux métaux

(Cr, Cd, As) (Hu *et al.* 2005; Habuda-Stanić & Nujić 2015) car elles possèdent une forte affinité pour les contaminants, une cinétique d'adsorption rapide et une réactivité élevée. De plus, grâce à leurs propriétés magnétiques, il est possible de les réutiliser en désorbant les contaminants (Hu *et al.* 2005).

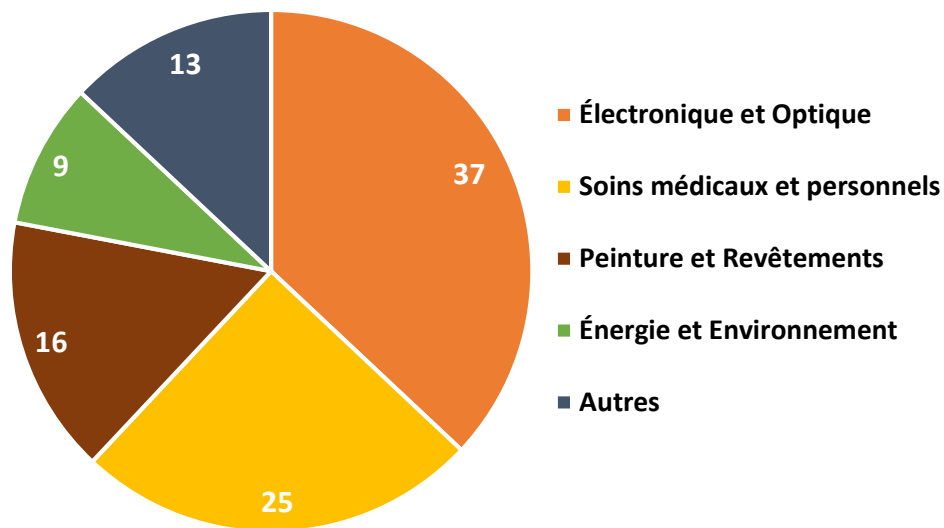


Figure 5 : Marché mondial des NPs d'oxydes métalliques par application (%) en 2016 (d'après Global Industry Report).

3.1.2. Propriétés physico-chimiques

3.1.2.1. Généralités

Les NPs d'oxydes de fer regroupent les oxydes de fer composés de fer ferreux, de fer ferreux et de fer ferrique (magnétite, Fe_3O_4) et les oxydes de fer contenant uniquement du fer ferrique dans leur structure (hématite, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; maghémite, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$; oxyhydroxides ferriques $\text{FeO}(\text{OH})$). Ce sont aux NPs de magnétite auxquelles nous nous sommes intéressés pour la suite de nos travaux, car c'est un modèle utilisé depuis plusieurs années au laboratoire et dont nous maîtrisons la synthèse. De plus, grâce à leurs multiples propriétés (détaillées ci-dessous), biocompatibilité et leur faible toxicité environnementale, elles sont un outil prometteur dans le domaine de la phytoremédiation. Elles sont l'une des principales formes d'oxydes de fer présentes dans la nature (Campos *et al.* 2015). C'est un minéral d'oxyde de fer

de couleur noire dont la teneur en fer avoisine les 70% (Majewski & Thierry 2007) et que l'on retrouve dans de nombreux types de roches.

Les NPs-OxFe manufacturées ont des propriétés spécifiques (taille, morphologie, composition) qui leur confèrent une réactivité chimique et des propriétés physiques distinctes (optiques, catalytiques, conductrices) (Tartaj *et al.* 2011). Celles-ci sont contrôlées lors de la synthèse, selon différents paramètres qui dépendent de la méthode choisie. Divers protocoles ont ainsi été développés, parmi lesquelles les méthodes chimiques (co-précipitation, microémulsion, méthode sol-gel, hydrothermale) sont plus diversifiées et plus employées que les méthodes par voie physique (pyrolyse laser) ou biologique (incubation microbiologique, extraits végétaux) (Wu *et al.* 2008; Naseem & Farrukh 2015; Ali *et al.* 2016). Ces méthodes permettent de contrôler la taille des NPs, les caractéristiques morphologiques, la chimie et la cristallinité des oxydes de fer, mais aussi, dans la mesure du possible, la dispersion en taille et l'état d'agrégation des NPs qui représentent souvent un facteur clé (Zhang *et al.* 2008). En effet, les propriétés des NPs induites pendant la synthèse sont cruciales car elles influencent le comportement des NPs dans leur milieu (agrégation, réactivité) et sont déterminantes par leurs impacts (notamment la toxicité) sur les contaminants présents.

3.1.2.2. Ratio Fe (II) / Fe (III)

La magnétite synthétisée en conditions anaérobiques dispose d'un rapport Fe(II)/Fe(III) proche de 0,5. En conditions aérobies (conditions oxydantes), la magnétite opère un changement de phase et se transforme en maghémite (**Figure 6**). Plus précisément le Fe²⁺ structural est oxydé en Fe³⁺ (Cornell & Schwertmann 2003). Cette transformation minérale peut être suivi par la mesure du ratio (R) Fe(II)/Fe(III). Un ratio de 0,5 correspond à la forme la plus réduite (dite magnétite stœchiométrique) tandis qu'un ratio de 0 correspond à la forme la plus oxydée (maghémite) (Gorski *et al.* 2010). Ces modifications stœchiométriques sont également influencées par le pH (Jungcharoen *et al.* 2022). Peng *et al.* (2018) ont remarqué qu'à pH 6 les ions Fe²⁺ sont libérés des NPs de magnétite et que le rapport Fe(II)/Fe(III) diminue. À pH 8, les NPs de magnétite adsorbent le Fe²⁺, augmentant le rapport stœchiométrique.

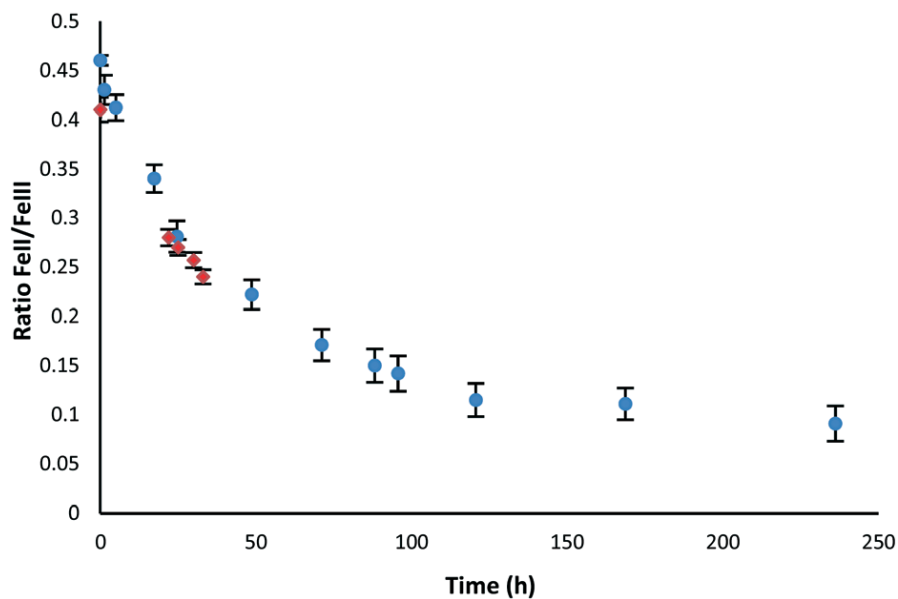


Figure 6 : Evolution du ratio Fe^{2+}/Fe^{3+} en fonction du temps (cercles bleus) (Demangeat *et al.* 2018).

3.1.2.3. Taille et réactivité chimique

La taille est une caractéristique majeure des NPs car elle conditionne directement la surface spécifique (unité de surface par unité de masse) d'une particule et donc sa réactivité et sa toxicité (surface de contact). Plus la taille d'une particule diminue, plus le nombre d'atomes se trouvant en surface, vis-à-vis du nombre d'atomes total de la particule, augmente. Plus précisément, il existe une relation exponentielle entre le nombre d'atomes présents à la surface d'une nanoparticule et sa taille (**Figure 7**).

Ainsi, les NPs ayant un diamètre inférieur à 10 nm sont des objets particulièrement réactifs du fait du rapport surface/volume très élevé (entre 30 et 90 % de leurs atomes sont présents en surface) (Auffan *et al.* 2009). La surface spécifique est l'une des propriétés déterminantes quant à la potentielle réactivité dans le milieu et la toxicité des NPs vis-à-vis des constituants et des organismes en présence.

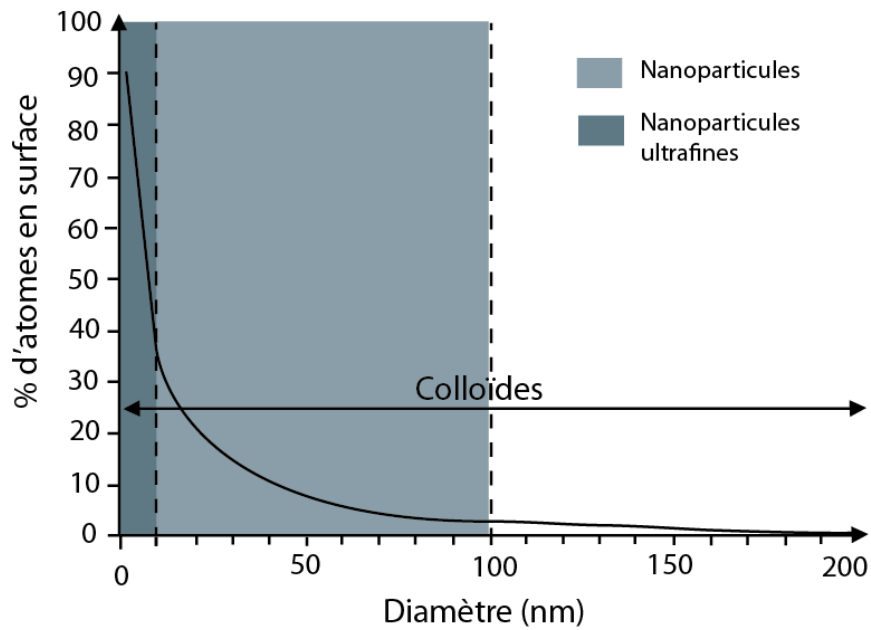


Figure 7 : Pourcentage d'atomes localisés à la surface d'une nanoparticule en fonction de son diamètre (d'après Auffan, 2007).

Ainsi de multiples réactions peuvent se produire à leur surface : des réactions de protonation/déprotonation, des réactions d'oxydo-reduction, de dissolution, ou encore des réactions d'adsorption qui permettent par exemple aux ETs de s'adsorber sur les NPs (**Figure 8**). Ces processus sont régulés, entres autres, par les conditions environnementales telles que le pH, la température, la force ionique et la présence de molécules organiques. Ces transformations sont déterminantes quant au devenir et comportement des NPs de magnétite dans l'environnement (agrégation, mobilité, réactivité, biodégradabilité) ainsi qu'à leur impact sur les organismes vivants (biodisponibilité vs toxicité) (Wagner *et al.* 2014).

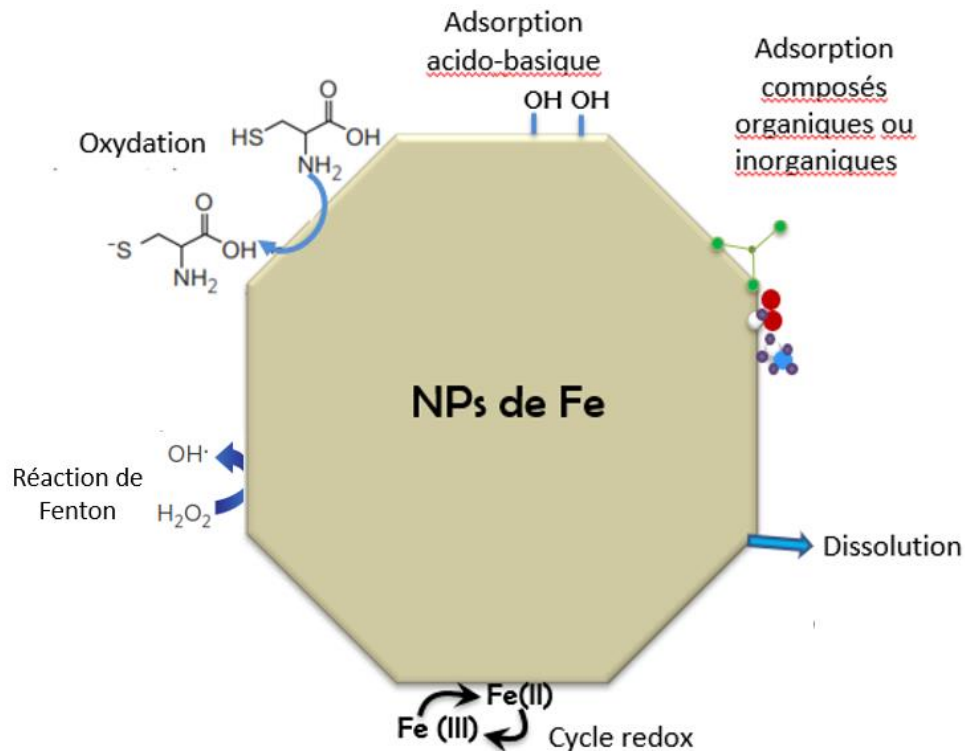


Figure 8 : Exemple d'interactions physicochimiques à la surface d'une nanoparticule de magnétite (d'après Auffan *et al.* 2009).

3.2. Les nanoparticules pour la remédiation environnementale

Pour les sites contaminés par des ETs, la réussite de la remédiation est compliquée par le fait que ces polluants ne se dégradent pas spontanément et qu'il n'est généralement pas possible d'excaver tout le sol contaminé. Par conséquent, la stabilisation chimique des ETs dans ces sols, par adsorption, précipitation de surface, incorporation structurale dans les organismes vivants ou échange d'ions, est une option viable pour ces sites, car cette technologie immobilise les contaminants dans les sols et réduit ainsi leur mobilité, leur biodisponibilité et leur bioaccessibilité. En fait, cette première étape de réduction de leur toxicité est cruciale pour l'établissement d'une couverture végétale sur les sites contaminés lors de la phytoremédiation. L'utilisation de NPs à des fins de remédiation peut alors renforcer les processus naturels d'atténuation, un mécanisme clé pour le rétablissement de systèmes environnementaux durables. Il a été affirmé que les nanotechnologies ont un grand potentiel en tant que technologie plus propre pour l'environnement, y compris l'atténuation de la

toxicité de divers ETs (Dickinson & Scott 2010). Les principaux mécanismes d'élimination des contaminants inorganiques par les NPs peuvent être divisés en cinq catégories : (1) adsorption (Cr, As, U, Pb, Ni, Se, Co, Cd, Zn, Ba) ; (2) réduction (Cr, As, Cu, U, Pb, Ni, Se, Co, Pd, Pt, Hg, Ag) ; (3) oxydation (As, U, Se, Pb) ; (4) précipitation (Cu, Pb, Cd, Co, Zn) ; et (5) co-précipitation (Cr, As, Ni, Se) (Martínez-Fernández *et al.* 2017). Les processus réactionnels globaux sont fortement influencés par un certain nombre de facteurs, en particulier les propriétés chimiques et la structure des NPs, la présence de plusieurs espèces de contaminants, les caractéristiques des polluants et l'hydrogéochimie de l'environnement aqueux (pH, conditions redox, espèces naturelles dissoutes, etc.) (O'Carroll *et al.* 2013).

Étant donné que les amendements appliqués pour le processus de stabilisation doivent être adaptés aux différents types de sol et qu'ils ne doivent pas présenter de risque pour les milieux environnementaux, l'application des NPs-OxFe dans les technologies d'assainissement constitue une alternative très intéressante à l'excavation et à la mise en décharge des sols, au lavage *ex situ* des sols, etc., car ces méthodes sont généralement perturbatrices et coûteuses (Martínez-Fernández *et al.* 2017). Les NPs ont été étudiées en tant qu'adsorbants d'ETs et leurs caractéristiques (capacités d'adsorption élevées) les rendent très prometteuses pour le traitement rentable des sols pollués (Nassar 2010). Ensuite, la nanoremédiation, définie comme l'utilisation de nanoparticules pour la remédiation de l'environnement, a le potentiel non seulement de réduire les coûts globaux de l'assainissement des sites contaminés à grande échelle, mais aussi de réduire le temps de nettoyage, éliminer la nécessité de traiter et d'éliminer le sol contaminé, et réduire la disponibilité de certains contaminants (Zhang 2003; Karn *et al.* 2009).

Dans ce domaine de la nanoremédiation, les chercheurs ont principalement concentré leur attention sur l'élimination des ETs des solutions aqueuses plutôt que sur ceux liés au sol. La nanoremédiation des sols contaminés est ainsi un sujet qui a fait l'objet de peu de recherches, comparé à l'élimination des polluants de l'eau ou des eaux usées (Sánchez *et al.* 2011). Sur la base de cette idée, les premières tentatives expérimentées mises en place pour une remédiation *ex situ* étaient composées de colonnes de sol sur lesquelles une suspension liquide de NPs était ajoutée pour extraire ou immobiliser les contaminants. Les espèces adsorbées sur les NPs peuvent ensuite être éliminées en appliquant de légers gradients gravitationnels (centrifuges) ou magnétiques (dans le cas de NPs magnétiques, telles que la

magnétite) (Sánchez *et al.* 2011). Par la suite, des NPs artificielles ont été progressivement incorporées dans de nouvelles stratégies *in situ* pour la phytoremédiation.

Bien que l'utilisation des plantes pour la phytoremédiation et leur capacité à accumuler et à tolérer des concentrations élevées de métaux aient été explorées, et qu'une quantité importante de littérature soit disponible, il n'en va pas de même pour l'intégration de l'utilisation des NPs dans le cadre de la phytoremédiation. La compréhension de la réponse des plantes aux NPs-OxFe, seules ou en présence des ETs, serait un élément clé dans l'identification des mécanismes impliqués dans la tolérance au stress et la toxicité des NPs (Capaldi Arruda *et al.* 2015).

3.3. Devenir des nanoparticules dans les sols

Une fois dans l'environnement, les NPs-OxFe interagissent entre elles et avec leur milieu via divers processus. Ces interactions affectent non seulement leur devenir et comportement dans les sols (mobilité, biodisponibilité, toxicité) mais aussi, leurs impacts sur le milieu (dynamique géochimique des écosystèmes) (Joo & Zhao 2017). Les transformations qui en résultent sont les suivantes :

- L'agrégation des NPs, induite par les propriétés du milieu (pH, force ionique) ou par la présence de constituants favorisant leur agrégation/dispersion (Vindedahl *et al.* 2016) ;
- Les transformations chimiques telle que l'oxydation de la magnétite en maghémite est un exemple de transformation structurale spontanée pouvant se produire en conditions naturelles (aérobies) (Frison *et al.* 2013). Ces transformations peuvent modifier les propriétés magnétiques des NPs ainsi que les propriétés physico-chimiques de surface, affectant leur comportement, mobilité et réactivité chimique ;
- La complexation d'ions ou de ligands inorganiques ou organiques à la surface des NPs-OxFe peut modifier leur état d'agrégation mais aussi le transport, la disponibilité, la spéciation/toxicité et/ou la biodégradabilité des substances adsorbées (Otero-Fariña *et al.* 2015) ;
- En fonction des conditions Eh et pH du milieu, certains métaux peuvent précipiter et former une nouvelle phase à partir de l'oxyde initial ;

- La solubilisation des NPs-OxFe, qui résulte des conditions Eh et pH de la solution de sol et est favorisée par la présence de molécules organiques comme celles produites par les végétaux et microorganismes pour dissoudre les oxydes de fer dans les sols (Dwivedi *et al.* 2015).

Ces modifications, qui dépendent avant tout des conditions physico-chimiques du milieu et de leur composition, sont importantes et nécessitent d'être considérées puisqu'elles peuvent affecter la mobilité des NPs, ainsi que leur biodisponibilité et leur toxicité pour les organismes du sol.

3.4. Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur les plantes

La nanoécotoxicologie est une branche de la toxicologie qui se concentre sur la mesure de la toxicité des NPs qui entrent en contact avec des organismes tels que les plantes, les bactéries, les poissons et les invertébrés (Handy *et al.* 2008). Une bonne compréhension des interactions des NPs avec le système végétal est d'une importance capitale pour l'évaluation de leur toxicité et de leur transport dans le réseau trophique (Anjum *et al.* 2016). Pour comprendre et quantifier les risques potentiels pour les plantes, il faut étudier la mobilité, la biodisponibilité, la toxicité et la persistance des NPs fabriquées. Comme le montre la **Figure 9**, qui présente les tendances générales des effets des NPs-OxFe sur les plantes d'après la littérature (Martínez-Fernández *et al.* 2017), il existe suffisamment de preuves que les NPs-OxFe peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et néfastes sur les systèmes végétaux aux niveaux physiologique, biochimique, nutritionnel et génétique. Les interactions entre les plantes et les NPs-OxFe peuvent nous éclairer sur les conséquences environnementales des nanotechnologies, mais, les recherches sur la toxicité des NPs-OxFe sont nettement insuffisantes (Anjum *et al.* 2016) et doivent être améliorées.

Les différences apparentes dans la toxicité des NPs-OxFe pour les plantes peuvent provenir de leurs propriétés chimiques (réactivité) et physiques (taille, forme, agrégation) et de la dose (fortes ou faibles concentrations), du temps d'exposition, des plantes (espèces, âge, état physiologique) et des conditions expérimentales (en hydroponie, dans les sols, en plein champ, en serre, etc.) utilisées (Amde *et al.* 2017).

NM / Effect	Germination	Uptake	Translocation	Water balance	Nutrition	N metabolism	Oxidative stress	Chlorophylls	Genotoxicity	Shoot growth	Root Growth
nFe ₂ O ₃											
nFe ₃ O ₄											

	+ effect/ stimulation
	- effect/ inhibition
	No effect
	Unknown

Figure 9 : Effets décrits dans la littérature des NPs-OxFe sur la physiologie des plantes pendant l'assainissement de l'environnement (d'après Martínez-Fernández *et al.* 2017).

3.4.1. Effets sur la physiologie végétale

Les principaux effets des NPs concernent généralement la germination, la croissance et la production des chlorophylles (Kim *et al.* 2014). **Le Tableau 4** résume les résultats des principales études réalisées sur l'exposition de diverses espèces à des NPs-OxFe.

Ainsi, une toxicité faible sur la germination après exposition des graines aux NPs de Fe₃O₄ a été rapportée pour la laitue (*Lactuca sativa*), le concombre (*Cucumis sativus*) et l'épinard (*Spinacia oleracea*) (Barrena *et al.* 2009; García *et al.* 2011) ; tandis que le blé et le maïs n'ont pas été affectés (Iannone *et al.* 2016; Jalali *et al.* 2017).

D'une manière générale, l'exposition aux NPs entraîne des changements dans l'état nutritionnel des plantes et le développement est affecté négativement, mais des effets positifs ont également été documentés. Ainsi, des études ont révélé que l'absorption plus faible des nutriments est liée au fait que les NPs obstruent les ouvertures des racines et inhibent à la fois la conductivité hydraulique et l'absorption des nutriments dans les racines (Martínez-Fernández *et al.* 2016), bien que les NPs ayant une surface spécifique élevée puissent également contribuer à séquestrer les nutriments à leur surface. Martínez-Fernández *et al.* (2016) ont détecté une réduction significative des concentrations d'oligo-éléments dans les pousses et les racines de tournesol (*Helianthus annuus*) exposées aux NPs de Fe₂O₃, sans changement de leurs concentrations dans la sève. Inversement l'apport de NPs-OxFe augmente la teneur en fer soluble dans la solution du sol et, en tant que nutriment essentiel pour les plantes, le fer agit comme cofacteur pour divers processus physiologiques et métaboliques (Zia-ur-Rehman *et al.* 2018). Des études rapportent l'augmentation de la teneur

en oligo-éléments et hydrates de carbone lors de traitement par des NPs-OxFe et NPs-Fe chez *T.ammi* et *A.thaliana* (Yoon *et al.* 2019; Ghassemi-Golezani & Abdoli 2021).

De plus, les NPs peuvent interagir avec les protéines associées aux photosystèmes, à la machinerie de synthèse de l'amidon et/ou à la translocation des hydrates de carbone (Krishnaraj *et al.* 2012). La teneur en chlorophylle étant considérée comme un indice du complexe total collecteur de la lumière et des composants du transport des électrons présents dans les membranes des chloroplastes (Terry 1983), elle est utilisée comme indicateur de stress chez les plantes. Des études sur la biodisponibilité des NPs Fe₂O₃ chez *A. thaliana*, réalisées par Marusenko *et al.* (2013), suggèrent que les NP-OxFe ne sont pas utilisées comme source de Fe induisant l'apparition de symptômes d'une carence en Fe. Les NPs de fer ont réduit l'accumulation de chlorophylles dans les feuilles de *L. sativa* (Trujillo-Reyes *et al.* 2014) et *H. annuus* (Martínez-Fernández *et al.* 2016), cet effet étant lié à la réduction de la conductivité hydraulique des racines et au transport de nutriments dissous à partir de la solution, en particulier pour le Mg puisque ce nutriment est associé à la synthèse des chlorophylles.

D'autre part, il existe de nombreuses références concernant les effets positifs des NPs-OxFe sur la croissance et la production de biomasse. Celle-ci a notamment favorisé l'élongation des racines chez le potiron (Wang *et al.* 2011). Des tournesols traités avec des NPs de Fe₂O₃ dans un sol contaminé par le Zn ont montré une augmentation de 25% de la biomasse des pousses, liée à la capacité d'adsorption du Zn par les NPs-OxFe (Martínez-Fernández *et al.* 2015). Ces résultats soulignent l'applicabilité de ces NPs-OxFe en tant qu'amendement lors de la phytoremédiation en raison de son immobilisation des ETs dans le sol, stimulant la croissance des plantes en rendant les contaminants moins disponibles. Cependant, une expérience supplémentaire avec la même espèce en culture hydroponique a montré que les traitements avec les mêmes NPs de Fe₂O₃ réduisaient la fonctionnalité des racines, modifiaient l'état nutritionnel des plantes et entraînaient des réductions de la teneur en eau des plantes (Martínez-Fernández *et al.* 2016). Trujillo-Reyes *et al.* (2014) ont également trouvé que les NPs de Fe₃O₄ réduisaient la taille des racines de *L. sativa* et modifiaient leur architecture, tout en affectant la teneur en eau des racines et l'accumulation de chlorophylles dans les feuilles. Finalement, la production de biomasse n'est que la conséquence de la

combinaison de l'ensemble des effets positifs et négatifs à différents niveaux physiologiques de la plante (**Figure 10**).

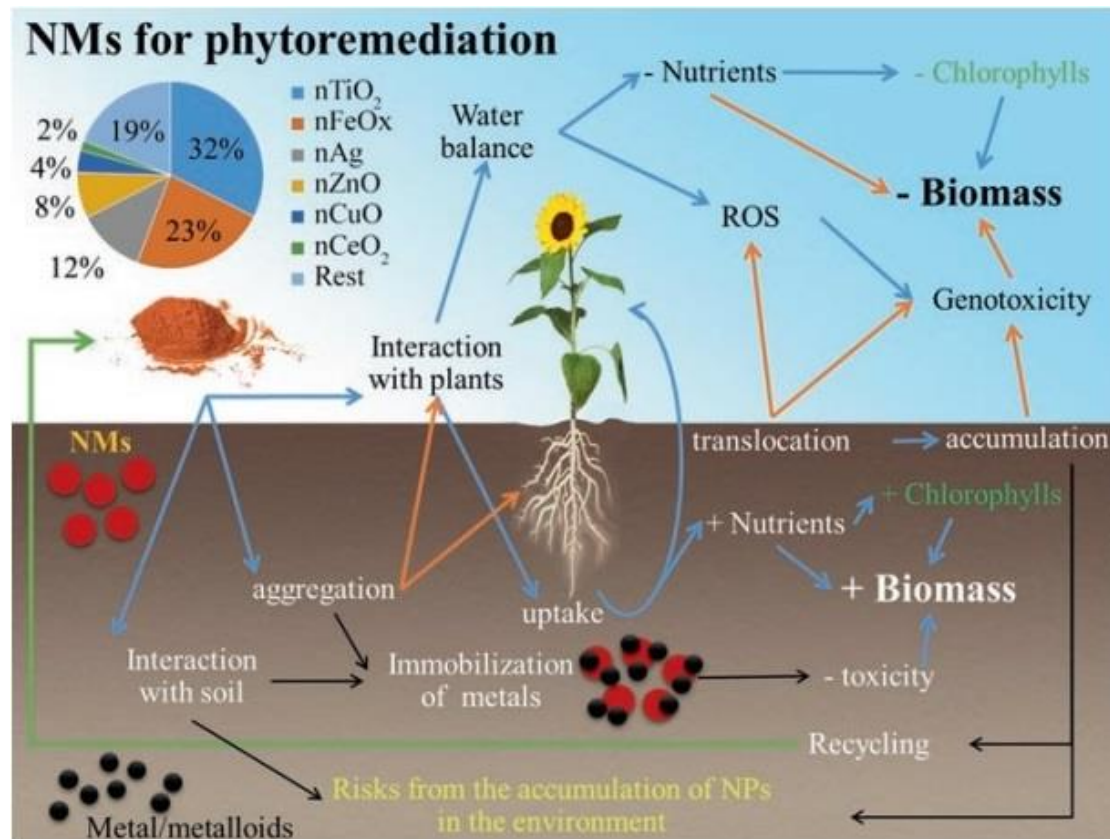


Figure 10 : Interaction des NPs avec les différents composants du sol et de la biosphère. En fonction de l'équilibre entre tous les effets positifs et négatifs à différents niveaux physiologiques de la plante, celle-ci montrera l'effet global sur la production de biomasse (Martínez-Fernández *et al.* 2017).

3.4.2. Stress oxydatif

Les NPs-OxFe peuvent être à l'origine d'augmentations significatives de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de leurs conséquences ultérieures (telles que les dommages aux membranes), ainsi que de la modulation des composants du système de défense antioxydant et de l'homéostasie redox cellulaire chez les plantes. La formation et la libération de ROS entraînent la conversion d'acides gras en peroxydes lipidiques toxiques, ce qui perturbe les membranes biologiques (Gratão *et al.* 2005) et provoque la pénétration des

NPs et ETs dans la cellule. Aussi les tissus lésés par le stress oxydatif présentent généralement une concentration accrue de malondialdéhyde (MDA) (Wang *et al.* 2011). Le MDA est un marqueur du stress oxydant et un indicateur de l'intégrité membranaire. Pour contrer les effets délétères des ROS les cellules végétales ont développé divers mécanismes de défense comprenant des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Les enzymes superoxyde dismutases (SOD) et catalases (CAT) sont impliquées respectivement dans la détoxification de O_2^- et H_2O_2 , empêchant ainsi la formation de radicaux OH^\bullet .

Selon les études, les NPs-OxFe peuvent induire du stress oxydatif via la production de ROS ou à l'inverse semblent agir comme des antioxydants via leur activité similaire à la peroxydase permettant de lutter contre le stress oxydatif. Elles pourraient aussi favoriser la réponse antioxydante des plantes face au stress oxydatif. Ainsi, Wang *et al.* (2019) émettent l'hypothèse qu'un traitement par les NPs de magnétite serait responsable d'un stress oxydatif chez les plantes, et sous ce stress les mécanismes antioxydants seraient activés. Selon d'autres chercheurs, les NPs de maghémite (Tombuloglu *et al.* 2019) et magnétite (Gao *et al.* 2007) agiraient comment des nanoenzymes capables de piéger les ROS. Demangeat *et al.* (2021) ont montré un effet bénéfique des NPs-OxFe avec une diminution de la peroxydation lipidique et une augmentation de l'activité antioxydante chez le tournesol (*Helianthus annuus*) ; ce qui suggère un effet positif des NPs-OxFe. Des résultats similaires ont été obtenus chez le blé (Iannone *et al.* 2016) et le chêne (*Quercus Macdougalii*) (Pariona *et al.* 2017).

3.4.3. Equilibre hydrique

En raison de leur importance pour la croissance, l'absorption des nutriments, le stress et la production de biomasse des plantes, il semble primordial de s'intéresser à l'étude des NPs à l'interface racine-sol, y compris des mesures des relations hydriques des plantes (Bolan *et al.* 2014). La présence de NPs à la surface des racines pourrait modifier la chimie de surface de la racine de telle sorte qu'elle affecte la manière dont les racines interagissent avec leur environnement (Cañas *et al.* 2008). Par exemple, on sait que les ETs peuvent réduire la conductivité hydraulique des racines, ce qui entraîne une diminution de la teneur en eau de la plante, du potentiel de turgescence et de la croissance (Martínez-Fernández *et al.* 2011), mais on ne sait pas comment les NPs métalliques influencent le transport de l'eau à travers les racines. Martínez-Fernández *et al.* (2015, 2016) ont constaté une réduction de la conductivité hydraulique des racines chez les plantes de *H. annuus* traitées avec des NPs Fe_2O_3

en culture hydroponique, mais aucun changement dans l'état hydrique interne des plantes cultivées dans un sol contaminé traité avec les mêmes NPs. D'autres travaux suggèrent encore que les NPs augmentent l'expression des aquaporines dans les racines (Martinez-Ballesta & Carvajal 2014), peut-être comme une réponse de la plante pour compenser une réduction de la conductivité hydraulique des racines.

3.4.4. Absorption, translocation et accumulation dans les plantes

La forte capacité réactive des NPs, due à leur surface spécifique élevée, peut stimuler leur adhésion à la paroi des cellules épithéliales de la racine. Les nanomatériaux ont également le potentiel de s'agréger, en raison des forces de Van der Waals ou d'autres interactions (Pradeep & Anshup 2009). Par conséquent, les NPs peuvent s'agréger le long des racines, bloquant leur absorption d'eau et perturbant ainsi l'ensemble de la physiologie de la plante et, en fin de compte, affectant leur croissance et leur développement (Klaine *et al.* 2008). Elle peut également affecter les interactions de la plante avec le milieu extérieur par une perturbation mécanique des membranes et des parois cellulaires, en bloquant les pores et en diminuant la conductivité hydraulique de la racine (Martínez-Fernández *et al.* 2016).

Les interactions possibles des NPs avec les racines des plantes comprennent l'adsorption sur la surface de la racine, l'incorporation dans la paroi cellulaire et l'absorption par la cellule (Nowack & Bucheli 2007; Lv *et al.* 2019). Pour pénétrer dans la stèle racinaire, deux voies s'offrent aux NPs (Judy & Bertsch 2014) (**Figure 11**). D'une part la voie symplasmique, qui nécessite de traverser la paroi cellulaire et la membrane plasmique d'une cellule endodermique ou exodermique, d'où elles pourront alors être transportées d'une cellule à l'autre par le réseau de plasmodesmes. D'autre part la voie apoplasmique dans laquelle les NPs cheminent dans l'apoplaste jusqu'à être bloquées par les bandes Caspari. Dans ce cas elles devront emprunter la voie symplasmique pour entrer dans la stèle. Pour traverser une paroi cellulaire intacte, on a émis l'hypothèse que les NPs devaient se déplacer passivement à travers les pores de la paroi cellulaire, ce qui suggère que l'absorption par les plantes est très sélective en termes de taille. Néanmoins, les NPs pourraient être incorporées passivement dans l'apoplaste de l'endoderme ; elles sont alors soumises à la perméabilité hautement sélective des membranes avant d'atteindre le cylindre central (Judy & Bertsch 2014). On suppose généralement qu'il est difficile pour les NPs de plus de 20 nm de pénétrer à travers la paroi cellulaire puisque la taille des pores de cette dernière varie de 2 à 20 nm

(Rico *et al.* 2011; Anjum *et al.* 2016). Roy & Bhattacharya (2012) ont suggéré que les NPs peuvent pénétrer dans les cellules végétales en se liant à des protéines porteuses, par l'intermédiaire d'aquaporines et de canaux ioniques, en créant de nouveaux pores ou en se liant à des produits chimiques organiques présents dans le milieu ambiant. L'endocytose peut également être une voie importante par laquelle les NPs pénètrent dans les plantes (Anjum *et al.* 2016). Selon Jalali *et al.* (2017), lors d'une application foliaire des NPs, il semblerait que celles-ci pénètrent dans la plante via les stomates ou des fissures à la surface des feuilles et soient ensuite transportées dans la plante via des transporteurs et chélatants qui sont supposés faciliter le transport du fer (Kobayashi & Nishizawa 2012).

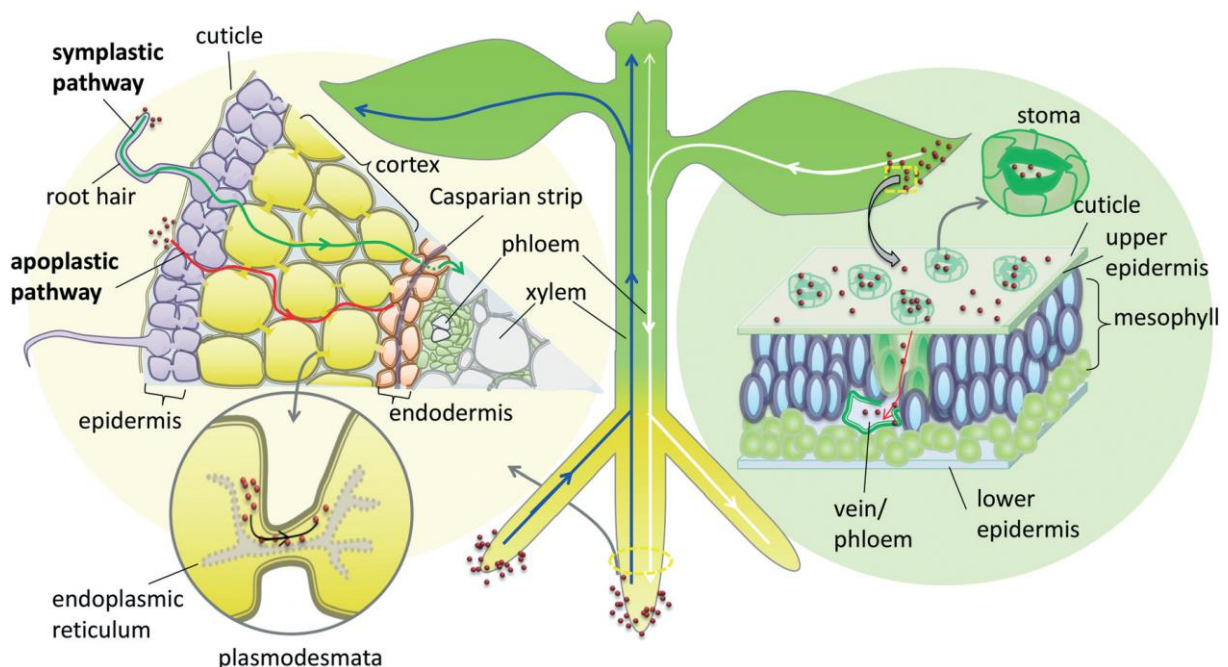


Figure 11 : Schéma des voies d'absorption et de translocation des NPs dans les plantes (Lv *et al.* 2019).

Bien que certaines NPs puissent être trouvées dans les cellules et les tissus des plantes (Rico *et al.* 2011), dans le cas des NPs-OxFe leur pénétration et accumulation varie selon les études. Zhu *et al.* (2008) n'ont signalé aucune absorption mesurable de NPs de magnétite par des citrouilles (*Cucurbita maxima*) cultivées dans le sol ou le sable, ni par des plants de haricots de Lima. De même, Wang *et al.* (2011) n'ont signalé aucune absorption de NPs de Fe_3O_4 (25 nm de diamètre) par des plants de citrouille. En revanche, ces mêmes NPs ont été retrouvées chez l'orge dans les parties aériennes et racinaires sans pénétration cellulaire (Tombuloglu *et*

al. 2019). Chez le potiron, cultivé cette fois en hydroponie, elles ont été détectées dans les feuilles et racines, les tiges proches des racines ainsi qu'en surface racinaire (Zhu et al, 2008). Avec un traitement de 400 mg.L⁻¹ de NPs de magnétite, leur présence est détectée dans les racines du melon (Wang, et al. 2019). Chez le blé tendre, les NPs de magnétite ont pénétré dans les racines via la voie apoplastique puis ont été détectées dans les parois des cellules épidermiques racinaires (Iannone et al. 2016).

Après avoir pénétré dans la plante, les NPs sont ensuite transportées vers les parties aériennes par les vaisseaux du xylème et phloème avant d'être stockées (Lv et al. 2019). Il existe de nombreuses différences physico-chimiques entre les espèces végétales, telles que des variations de la conductivité hydraulique, de la taille des pores de la paroi cellulaire et de la chimie de l'exsudat racinaire, qui pourraient influencer la bioaccumulation des NPs. Par exemple, Zhu et al. (2008) ont observé une accumulation de NPs de Fe₃O₄ (taille minimale de 20 nm) dans *Vigna radiata* (haricot mungo) et dans la citrouille cultivée dans un milieu aqueux, mais n'ont pas observé de bioaccumulation lors de la même expérience avec *Phaseolus lunatus* (haricot de Lima) ou *Phaseolus limensis*, cultivées soit dans le sol, soit dans le sable. Récemment, l'absence d'absorption et de translocation de NPs de Fe₂O₃ a été démontrée par Martínez-Fernández et al. (2016), sans la présence de ces NPs dans la sève de *Helianthus annuus*, peut-être en raison de l'agrégation des NPs à la surface des racines.

Tableau 4 : Synthèse des principales études sur les effets favorables ou neutres des NP-OxFe sur les plantes.

Nanoparticules et Concentrations	Espèce végétale	Type de culture et durée	Effets	Références
Fe ₃ O ₄ 125 – 250 - 500 et 1000 mg.L ⁻¹	<i>Hordeum vulgare</i> (orge)	Hydroponie 3 semaines	Augmentation de la biomasse et croissance. Les doses élevées de NPs ont réduit le stress oxydatif.	(Tombuloglu <i>et al.</i> 2019)
Fe ₂ O ₃ 0,5 – 0,8 – 1 - 2 mg.L ⁻¹	<i>Brassica napus</i> (colza)	Sol 15 jours	Augmentation de la longueur des feuilles à 2 mg.L ⁻¹ et baisse du stress oxydatif	(Palmqvist <i>et al.</i> 2017)
Fe ₃ O ₄ 30 – 100 mg.L ⁻¹	<i>Lolium perenne</i> (raygras) et <i>Cucurbita mixta</i> (citrouille)	Hydroponie 18 jours	Elongation racinaire. Augmentation du stress oxydatif et des activités des enzymes antioxydantes.	(Wang <i>et al.</i> 2011)
Fe ₃ O ₄ 500 mg.L ⁻¹	<i>Cucurbita maxima</i> (citrouille)	Hydroponie 20 jours	Pas d'effets phytotoxiques observés	(Zhu <i>et al.</i> 2008)
Fe ₃ O ₄ 100 ppm	<i>Zea mays</i> (maïs)	Sol Cycle de culture complet	Augmentation de la biomasse et poids des grains, de l'efficacité photosynthétique. Amélioration de la gestion des ROS.	(Jalali <i>et al.</i> 2017)
Fe ₃ O ₄ 400 – 2000 - 4000 mg.L ⁻¹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Substrat solide 18 jours	Inhibition de l'élongation racinaire.	(Lee <i>et al.</i> 2010)
Fe ₃ O ₄ @acide citrique 5 – 10 - 15 et 20 mg.L ⁻¹	<i>Triticum aestivum</i> (blé)	Hydroponie 5 jours	Pas d'effet que la germination et la croissance. Les NPs n'ont pas induit de peroxydation lipidique ou d'accumulation de ROS.	(Iannone <i>et al.</i> 2016)
Fe ₃ O ₄ @acide citrique 750 mg.L ⁻¹	<i>Quercus macdougalii</i> (chêne)	Sol reconstitué 12 semaines	Augmentation de la germination, croissance, biomasse sèche, chlorophylle.	(Pariona, Martínez, <i>et al.</i> 2017)
NPs de ferrihydrite et hématite 1 – 2 – 4 et 6 g.L ⁻¹	<i>Zea mays</i> (maïs)	Hydroponie 12 jours	Pas d'impact sur la germination pour les deux NP-OxFe. Augmentation de la croissance et teneur en pigment jusqu'à 4 g.L ⁻¹	(Pariona, Martínez, <i>et al.</i> 2017)
Fe ₂ O ₃ 2 – 20 – 50 mg.L ⁻¹	<i>Citrullus lanatus</i> (pastèque)	Sol sableux 5 jours	Augmentation des indices de germination et de croissance. Effets les plus marqués de l'augmentation de l'activité racinaire à 20 mg.L ⁻¹ .	(Li <i>et al.</i> 2013)
Fe ₂ O ₃ 1 % poids sol sec	<i>Helianthus annuus</i> (tournesol)	Sol 50 jours	Augmentation de la biomasse aérienne sèche et de la teneur en oligo-éléments	(Martínez-Fernández <i>et al.</i> 2015)
Fe ₃ O ₄ 10 g.kg ⁻¹	<i>Helianthus annuus</i> (tournesol)	Colonne de sol 57 jours	Pas d'effet sur la croissance ni l'efficacité photosynthétique. Diminution de la peroxydation lipidique.	(Demangeat <i>et al.</i> 2021)

4. Objectifs de la thèse

L'enjeu de ce travail de thèse est d'évaluer la compatibilité environnementale ainsi que le potentiel de phytoremédiation des nanoparticules d'oxyde de fer et plus particulièrement des nanoparticules de magnétite tout au long de leur cycle de vie. Ainsi, les principaux objectifs de cette thèse peuvent être regroupés en trois points majeurs :

- déterminer l'impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le développement et la physiologie des plantes ;
- caractériser leur comportement et devenir dans l'environnement ;
- déterminer leur participation à l'amélioration de la phytoremédiation dans un contexte de pollution aux éléments traces et leur impact sur les dits contaminants.

Afin de répondre aux questions qui s'y rapportent, mon travail s'est ainsi organisé autour de deux expérimentations principales. Pour chacune de ses expérimentations, une culture à long terme a été réalisée (90 jours) dans des dispositifs de culture préalablement développés permettant à la fois d'étudier la plante, le sol et les solutions de lessivage. Des analyses physiologiques et biochimiques des plantes ont été menées ainsi que des analyses géochimiques du système eau-sol-plante afin de répondre aux objectifs de la thèse.

Une première expérimentation a porté sur l'étude de l'impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le comportement et le devenir du plomb dans un système eau-sol-plante ; ainsi que leur potentiel participation à l'amélioration de la phytoextraction par le tournesol. Nous avons porté notre intérêt sur le plomb car c'est un ET ubiquitaire dans l'environnement, toxique pour les organismes vivants, avec aucune fonction biologique associée, et difficile à remédier car peu biodisponible. Le tournesol, lui, a été sélectionné comme modèle biologique car cette plante n'est pas spécialisée dans l'accumulation spécifique d'un seul ET mais au contraire a la capacité d'en accumuler plusieurs. Elle est notamment capable d'accumuler 5 à 7 fois plus de Pb que d'autres espèces végétales qui ne l'accumulent pas. De plus, elle a une tolérance élevée aux stress abiotiques et peu produire une forte biomasse ainsi qu'un système racinaire dense.

Une seconde partie a, quant à elle, été menée sur l'étude de l'impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le comportement et le devenir d'un cocktail d'éléments traces dans un système eau-sol-plante ; ainsi que leur potentielle participation à l'amélioration de la phytoextraction par le tournesol. Une mixture de 5 ETs (Zn, Pb, Cu, As, Cd)

a été sélectionnée parmi ceux les plus présents dans les sols contaminés dans le but de se rapprocher des conditions naturelles. En effet les ETs sont rarement présents seuls dans l'environnement mais plutôt retrouvés en mélange selon l'historique de pollution. Ils ont été introduits dans le sol aux concentrations limites établies par l'arrêté du 8 janvier 1998 indiquant les teneurs limites en éléments métalliques dans les boues et dans les sols susceptibles de recevoir ces boues, afin de déterminer un potentiel effet additif toxique.

Bibliographie

- Abdu N., Abdullahi A.A., Abdulkadir A. (2017) Heavy metals and soil microbes. *Environmental Chemistry Letters* **15**:65–84.
- ADEME (2007) *Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine*. ADEME. [online] URL: https://bibliothèque.ademe.fr/cadic/3628/_57992__SOGREAH.pdf (accessed 25 May 2023).
- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* **91**:869–881.
- Ali A., Zafar H., Zia M., ul Haq I., Phull A.R., Ali J.S., Hussain A. (2016) Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* **9**:49–67.
- Amde M., Liu J., Tan Z.-Q., Bekana D. (2017) Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution* **230**:250–267.
- Anjum N.A., Rodrigo M.A.M., Moulick A., Heger Z., Kopel P., Zítka O., Adam V., Lukatkin A.S., Duarte A.C., Pereira E., Kizek R. (2016) Transport phenomena of nanoparticles in plants and animals/humans. *Environmental Research* **151**:233–243.
- Anjum N.A., Umar S., Iqbal M., Khan N.A. (2011) Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate-glutathione cycle metabolism. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**:92–99.
- ANSES (2014) Evaluation des risques liés aux nanomatériaux - Avis de l'ANSES. n°2012-SA-0273.
- Antoni V. (2013) BASOL: un panorama des sites et sols pollués ou potentiellement pollués nécessitant une action des pouvoirs public. Etudes & documents-Commissariat Général au développement durable-Observations et statistiques.
- Antoniadis V., Shaheen S.M., Levizou E., Shahid M., Niazi N.K., Vithanage M., Ok Y.S., Bolan N., Rinklebe J. (2019) A critical prospective analysis of the potential toxicity of trace element regulation limits in soils worldwide: Are they protective concerning health risk assessment? - A review. *Environment International* **127**:819–847.
- Arthur E.L., Rice P.J., Rice P.J., Anderson T.A., Baladi S.M., Henderson K.L.D., Coats J.R. (2005) Phytoremediation—An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**:109–122.
- Auffan M., Rose J., Bottero J.-Y., Lowry G.V., Jolivet J.-P., Wiesner M.R. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* **4**:634–641.
- Bååth E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* **47**:335–379.

- Baize D. (1997) *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France): Références et stratégies d'interprétation. Programme ASPITET*. Editions Quae.
- Baize D. (2007) Les éléments traces métalliques (ETM) dans les sols. Tout ce qu'il faut savoir ! pp 1-28. [online] URL: <http://www.denis-baize.fr/documents/POITIERS-Chap.1-Generalites.pdf>
- Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puentes V. (2009) Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* **75**:850–857.
- BASOL (2020) *Base des sols pollués*. Ministère de la transition écologique et solidaire. [online] URL: <https://basol.developpement-durable.gouv.fr/accueil.php> (accessed 12 September 2022).
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:21–34.
- Blaylock M.J., Huang J.W. (2000) *Phytoextraction of metals. In: Phytoremediation of Toxic Metals : Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley & Sons, pp 53–70.
- Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M.B., Scheckel K. (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials* **266**:141–166.
- Borrelli P., Robinson D.A., Fleischer L.R., Lugato E., Ballabio C., Alewell C., Meusburger K., Modugno S., Schütt B., Ferro V., Bagarello V., Oost K.V., Montanarella L., Panagos P. (2017) An assessment of the global impact of 21st century land use change on soil erosion. *Nature Communications* **8**:2013.
- Bourrelier P.-H., Berthelin J., Pédro G. (1998) *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Tec & doc-Lavoisier, Paris.
- Brennan M.A., Shelley M.L. (1999) A model of the uptake, translocation, and accumulation of lead (Pb) by maize for the purpose of phytoextraction. *Ecological Engineering* **12**:271–297.
- Burnol A., Duro L., Grive M. (2006) *Elements traces métalliques : Guide méthodologique. Rapport d'étude*. INERIS.
- Campos E.A., Stockler Pinto D.V.B., Oliveira J.I.S. de, Mattos E.D.C., Dutra R.D.C.L. (2015) Synthesis, Characterization and Applications of Iron Oxide Nanoparticles - a Short Review. *Journal of Aerospace Technology and Management* **7**:267–276.
- Cañas J.E., Long M., Nations S., Vadan R., Dai L., Luo M., Ambikapathi R., Lee E.H., Olszyk D. (2008) Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:1922–1931.
- Capaldi Arruda S.C., Diniz Silva A.L., Moretto Galazzi R., Antunes Azevedo R., Zezzi Arruda M.A. (2015) Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta* **131**:693–705.

- Chauhan P., Rajguru A.B., Dudhe M.Y., Mathur J. (2020) Efficacy of lead (Pb) phytoextraction of five varieties of *Helianthus annuus* L. from contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation* **18**:100718.
- Chen Y.-T., Wang Y., Yeh K.-C. (2017) Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* **39**:66–72.
- Cho U.-H., Seo N.-H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**:113–120.
- Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**:309–315.
- Colombano S., Bataillard P., Séré G., Morel J.-L., Rouvreau L. (2014) Le sol en contexte de sites pollués. *Géosciences* **18**:56–61.
- Colombano S., Saada A., Guérin V., Bataillard P., Bellenfant G., Béranger S., Hube D., Blanc C., Zorning C., Girardeau I. (2010) *Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfice. Rapport final BRGM-RP-58609-FR.*
- Commissariat général au développement durable (2019) Sites et sols pollués ou potentiellement pollués. [online] URL: <https://www.notre-environnement.gouv.fr/themes/sante/la-pollution-des-sols-ressources/article/sites-et-sols-pollues-ou-potentiellement-pollues?type-ressource=liens&ancreretour=ancreretour1490&lien-ressource=5192&theme-ressource=440> (accessed 6 April 2023).
- Cornell R.M., Schwertmann U. (2003) *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, 1st edn. Wiley.
- Cristaldi A., Conti G.O., Jho E.H., Zuccarello P., Grasso A., Copat C., Ferrante M. (2017) Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology & Innovation* **8**:309–326.
- Dary M., Chamber-Pérez M.A., Palomares A.J., Pajuelo E. (2010) “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* **177**:323–330.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-le-Coz M., Grasset F., Hanna K., Kamagate M., Cabello-Hurtado F. (2018) Colloidal and chemical stabilities of iron oxide nanoparticles in aqueous solutions: the interplay of structural, chemical and environmental drivers. *Environmental Science: Nano* **5**:992–1001.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Roperch P., Compaoré G., Cabello-Hurtado F. (2021) Investigating the remediation potential of iron oxide nanoparticles in Cu-polluted soil–plant systems: coupled geochemical, geophysical and biological approaches. *Nanoscale Advances* **3**:2017–2029.

- Dickinson M., Scott T.B. (2010) The application of zero-valent iron nanoparticles for the remediation of a uranium-contaminated waste effluent. *Journal of Hazardous Materials* **178**:171–179.
- Direction générale de la prévention des risques S. des risques sanitaires liés à l'environnement des déchets et des pollutions diffuses (2019) *Eléments issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire*. Ministère de la transition écologique et solidaire.
- Dwivedi A.D., Dubey S.P., Sillanpää M., Kwon Y.-N., Lee C., Varma R.S. (2015) Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment. *Coordination Chemistry Reviews* **287**:64–78.
- Ernst, Young (2012) *Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France*. ADEME.
- Escande V., Velati A., Grison C. (2015) Ecocatalysis for 2H-chromenes synthesis: an integrated approach for phytomanagement of polluted ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research* **22**:5677–5685.
- Estelrich J., Escribano E., Queralt J., Busquets M.A. (2015) Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:8070–8101.
- Etim E. (2012) Phytoremediation and its mechanisms: A review. *International Journal of Environment and Bioenergy* **2**:120–136.
- Flessa H., Fischer W.R. (1992) Plant-induced changes in the redox potentials of rice rhizospheres. *Plant and Soil* **143**:55–60.
- Frison R., Cernuto G., Cervellino A., Zaharko O., Colonna G.M., Guagliardi A., Masciocchi N. (2013) Magnetite–Maghemite Nanoparticles in the 5–15 nm Range: Correlating the Core–Shell Composition and the Surface Structure to the Magnetic Properties. A Total Scattering Study. *Chemistry of Materials* **25**:4820–4827.
- Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X. (2007) Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **2**:577–583.
- Garbisu C., Alkorta I. (2001) Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* **77**:229–236.
- García A., Espinosa R., Delgado L., Casals E., González E., Puntos V., Barata C., Font X., Sánchez A. (2011) Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. *Desalination* **269**:136–141.
- Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M. (2009) Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* **176**:20–30.

- Ghassemi-Golezani K., Abdoli S. (2021) Improving ATPase and PPase activities, nutrient uptake and growth of salt stressed ajowan plants by salicylic acid and iron-oxide nanoparticles. *Plant Cell Reports* **40**:559–573.
- Ghosh M., Singh S.P. (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* **3**:1–18.
- Girard M.C., Walter C., Remy J.C., Berthelin J., Morel J.L. (2011) *Sols et environnement*. Dunod.
- González-Guerrero M., Escudero V., Saéz Á., Tejada-Jiménez M. (2016) Transition Metal Transport in Plants and Associated Endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia. *Frontiers in Plant Science* **7**:1088.
- Gorski C.A., Nurmi J.T., Tratnyek P.G., Hofstetter T.B., Scherer M.M. (2010) Redox Behavior of Magnetite: Implications for Contaminant Reduction. *Environmental Science & Technology* **44**:55–60.
- Gratão P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A., Gratão P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**:481–494.
- Grelle C., Fabre M.-C., Leprêtre A., Descamps M. (2000) Myriapod and isopod communities in soils contaminated by heavy metals in northern France. *European Journal of Soil Science* **51**:425–433.
- Groupement d'intérêt scientifique sur les sols (France) (2011) *L'état des sols de France: les services rendus par les sols, la diversité des sols de France, l'état des sols de France et son évolution*. GIS Sol, S.l.
- Grybos M., Davranche M., Gruau G., Petitjean P., Pédrot M. (2009) Increasing pH drives organic matter solubilization from wetland soils under reducing conditions. *Geoderma* **154**:13–19.
- Gupta A.K., Gupta M. (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**:3995–4021.
- Habuda-Stanić M., Nujić M. (2015) Arsenic removal by nanoparticles: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **22**:8094–8123.
- Hadi F., Bano A., Fuller M.P. (2010) The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays L.*): the role of plant growth regulators (GA3 and IAA) and EDTA alone and in combinations. *Chemosphere* **80**:457–462.
- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. (2008) The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* **17**:315–325.
- Hasan S.A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* **30**:165–174.

- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Trace Elements in the Rhizosphere, G.R. Gobran, W.W. Wenzel, E. Lombi. Florida, USA, pp 25–41.
- Hooda P. (2010) *Trace elements in soils*, Peter S. Hooda.
- Hossain M.A., Hossain M.Z., Fujita M. (2009) Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science* **3**:53–64.
- Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T., Fujita M. (2012) Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany* **2012**:e872875.
- Hou D., Ding Z., Li G., Wu L., Hu P., Guo G., Wang X., Ma Y., O'Connor D., Wang X. (2018) A Sustainability Assessment Framework for Agricultural Land Remediation in China. *Land Degradation & Development* **29**:1005–1018.
- Hou D., O'Connor D., Igalavithana A.D., Alessi D.S., Luo J., Tsang D.C.W., Sparks D.L., Yamauchi Y., Rinklebe J., Ok Y.S. (2020) Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment* **1**:366–381.
- Hu J., Chen G., Lo I.M.C. (2005) Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Research* **39**:4528–4536.
- Hu Y., Cheng H., Tao S. (2016) The Challenges and Solutions for Cadmium-contaminated Rice in China: A Critical Review. *Environment International* **92–93**:515–532.
- Iannone M.F., Groppa M.D., de Sousa M.E., Fernández van Raap M.B., Benavides M.P. (2016) Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* **131**:77–88.
- Idoine N.E., Raycraft E.R., Shaw R.A., Hobbs S.F., Deady E.A., Everett P., Evans E.J., Mills A.J. (2022) *World Mineral Production 2016-2020*. British Geological Survey, Keyworth, Nottingham.
- Islam E., Yang X., Li T., Liu D., Jin X., Meng F. (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **147**:806–816.
- Jalali M., Ghanati F., Modarres-Sanavi A.M., Khoshgoftarmanesh A.H. (2017) Physiological effects of repeated foliar application of magnetite nanoparticles on maize plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* **203**:593–602.
- Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* **68**:167–182.

- Joo S.H., Zhao D. (2017) Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: A review. *Journal of Hazardous Materials* **322**:29–47.
- Judy J.D., Bertsch P.M. (2014) Chapter One - Bioavailability, Toxicity, and Fate of Manufactured Nanomaterials in Terrestrial Ecosystems. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 1–64.
- Jungcharoen P., Pédrot M., Heberling F., Hanna K., Choueikani F., Catrouillet C., Dia A., Marsac R. (2022) Prediction of nanomagnetite stoichiometry (Fe(ii)/Fe(iii)) under contrasting pH and redox conditions. *Environmental Science: Nano* **9**:2363–2371.
- Juste (1988) *Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol*. *Sciences du sol* **26**, pp 103-112.
- Kah M., Tufenkji N., White J.C. (2019) Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature Nanotechnology* **14**:532–540.
- Kammenga J., Laskowski R. (2000) *Demography in Ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Karley A.J., Leigh R.A., Sanders D. (2000) Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in Plant Science* **5**:465–470.
- Karn B., Kuiken T., Otto M. (2009) Nanotechnology and in Situ Remediation: A Review of the Benefits and Potential Risks. *Environmental Health Perspectives* **117**:1813–1831.
- Keeling S.M., Stewart R.B., Anderson C.W.N., Robinson B.H. (2003) Nickel and Cobalt Phytoextraction by the Hyperaccumulator *Berkheya coddii*: Implications for Polymetallic Phytomining and Phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **5**:235–244.
- Keunen E., Remans T., Bohler S., Vangronsveld J., Cuypers A. (2011) Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* **12**:6894–6918.
- Khan F.I., Husain T., Hejazi R. (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* **71**:95–122.
- Khot L.R., Sankaran S., Maja J.M., Ehsani R., Schuster E.W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection* **35**:64–70.
- Kim J.H., Lee Y., Kim E.-J., Gu S., Sohn E.J., Seo Y.S., An H.J., Chang Y.S. (2014) Exposure of Iron Nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* Enhances Root Elongation by Triggering Cell Wall Loosening. *Environmental Science & Technology* **48**:3477–3485.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. (2008) Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:1825–1851.

- Knigge T., Köhler H.-R. (2000) Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp 70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environmental Pollution* **108**:209–217.
- Kobayashi T., Nishizawa N.K. (2012) Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* **63**:131–152.
- Korshunova Y.O., Eide D., Gregg Clark W., Lou Guerinot M., Pakrasi H.B. (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**:37–44.
- Krämer U. (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* **16**:133–141.
- Krämer U. (2010) Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**:517–534.
- Krishnaraj C., Jagan E.G., Ramachandran R., Abirami S.M., Mohan N., Kalaichelvan P.T. (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry* **47**:651–658.
- Kumar A., Prasad M.N.V. (2018) Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **166**:401–418.
- Labudda M. (2013) Lipid Peroxidation as a Biochemical Marker for Oxidative Stress During Drought. An Effective Tool for Plant Breeding. E-wydawnictwo, Poland, 2013, <http://www.e-wydawnictwo.eu/document/documentpreview/3342>.
- Lasat M.M., Baker A.J.M., Kochian L.V. (1998) Altered Zn Compartmentation in the Root Symplasm and Stimulated Zn Absorption into the Leaf as Mechanisms Involved in Zn Hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **118**:875–883.
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews* **108**:2064–2110.
- Lee C.W., Mahendra S., Zodrow K., Li D., Tsai Y.-C., Braam J., Alvarez P.J.J. (2010) Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**:669–675.
- Lešková A., Javot H., Giehl R.F.H. (2022) Metal crossroads in plants: modulation of nutrient acquisition and root development by essential trace metals. *Journal of Experimental Botany* **73**:1751–1765.
- Li J., Chang P.R., Huang J., Wang Y., Yuan H., Ren H. (2013) Physiological Effects of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Towards Watermelon. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **13**:5561–5567.
- Li B., Zheng M., Xue H., Pang H. (2016) High performance electrochemical capacitor materials focusing on nickel based materials. *Inorganic Chemistry Frontiers* **3**:175–202.

- Lowry G.V., Avellan A., Gilbertson L.M. (2019) Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nature Nanotechnology* **14**:517–522.
- Lu A., Wang J., Qin X., Wang K., Han P., Zhang S. (2012) Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and origin of heavy metals in the agricultural soils in Shunyi, Beijing, China. *Science of The Total Environment* **425**:66–74.
- Lv J., Christie P., Zhang S. (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano* **6**:41–59.
- Majewski P., Thierry B. (2007) Functionalized Magnetite Nanoparticles—Synthesis, Properties, and Bio-Applications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* **32**:203–215.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*, 2nd edtn. Academic Press.
- Martinez-Ballesta M. del C., Carvajal M. (2014) New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Science* **217–218**:71–77.
- Martínez-Fernández D., Barroso D., Komárek M. (2016) Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environmental Science and Pollution Research* **23**:1732–1741.
- Martínez-Fernández D., Vítková M., Bernal M.P., Komárek M. (2015) Effects of Nanomagnetite on Trace Element Accumulation and Drought Response of *Helianthus annuus* L. in a Contaminated Mine Soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**:101.
- Martínez-Fernández D., Vítková M., Michálková Z., Komárek M. (2017) Engineered Nanomaterials for Phytoremediation of Metal/Metalloid-Contaminated Soils: Implications for Plant Physiology. In: Ansari AA, Gill SS, Gill R, R. Lanza G, Newman L (eds) *Phytoremediation*. Springer International Publishing, Cham, pp 369–403.
- Martínez-Fernández D., Walker D.J., Romero-Espinar P., Flores P., del Río J.A. (2011) Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. *Journal of Plant Physiology* **168**:2206–2211.
- Marusenko Y., Shipp J., Hamilton G.A., Morgan J.L.L., Keebaugh M., Hill H., Dutta A., Zhuo X., Upadhyay N., Hutchings J., Herckes P., Anbar A.D., Shock E., Hartnett H.E. (2013) Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution* **174**:150–156.
- Mench M., Morel J.L., Guckert A., Guillet B. (1988) Metal binding with root exudates of low molecular weight. *Journal of Soil Science* **39**:521–527.
- Motamen Salehi F., Khaemba D.N., Morina A., Neville A. (2016) Corrosive–Abrasive Wear Induced by Soot in Boundary Lubrication Regime. *Tribology Letters* **63**:19.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* **60**:193–207.

- Murakami T., Ise K., Hayakawa M., Kamei S., Takagi S. (1989) Stabilities of Metal Complexes of Mugenic Acids and Their Specific Affinities for Iron(III). *Chemistry Letters* **18**:2137–2140.
- Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**:199–216.
- Nahmani J., Lavelle P. (2002) Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. *European Journal of Soil Biology* **38**:297–300.
- Naseem T., Farrukh M.A. (2015) Antibacterial Activity of Green Synthesis of Iron Nanoparticles Using *Lawsonia inermis* and *Gardenia jasminoides* Leaves Extract. *Journal of Chemistry* **2015**:e912342.
- Nassar N.N. (2010) Rapid removal and recovery of Pb(II) from wastewater by magnetic nanoadsorbents. *Journal of Hazardous Materials* **184**:538–546.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **150**:5–22.
- Nriagu J.O. (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* **338**:47–49.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**:134–139.
- O’Carroll D., Sleep B., Krol M., Boparai H., Kocur C. (2013) Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources* **51**:104–122.
- Otero-Fariña A., Gago R., Antelo J., Fiol S., Arce F. (2015) Surface Complexation Modelling of Arsenic and Copper Immobilization by Iron Oxide Precipitates Derived from Acid Mine Drainage. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* **67**:493–508.
- Padmavathamma P.K., Li L.Y. (2007) Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water, Air, and Soil Pollution* **184**:105–126.
- Palmqvist N.G.M., Seisenbaeva G.A., Svedlindh P., Kessler V.G. (2017) Maghemite Nanoparticles Acts as Nanozymes, Improving Growth and Abiotic Stress Tolerance in *Brassica napus*. *Nanoscale Research Letters* **12**:631.
- Pariona N., Martínez A.I., Hdz-García H.M., Cruz L.A., Hernández-Valdes A. (2017) Effects of hematite and ferrihydrite nanoparticles on germination and growth of maize seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**:1547–1554.
- Pariona N., Martínez A.I., Hernández-Flores H., Clark-Tapia R. (2017) Effect of magnetite nanoparticles on the germination and early growth of *Quercus macdougalii*. *Science of The Total Environment* **575**:869–875.

- Patil R.M., Thorat N.D., Shete P.B., Bedge P.A., Gavde S., Joshi M.G., Tofail S.A.M., Bohara R.A. (2018) Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports* **13**:63–72.
- Pédrot M., Dia A., Davranche M. (2009) Double pH control on humic substance-borne trace elements distribution in soil waters as inferred from ultrafiltration. *Journal of Colloid and Interface Science* **339**:390–403.
- Peng H., Pearce C.I., Huang W., Zhu Z., N'Diaye A.T., Rosso K.M., Liu J. (2018) Reversible Fe(II) uptake/release by magnetite nanoparticles. *Environmental Science: Nano* **5**:1545–1555.
- Pérez P.A., Eugenio R.A. (2018) *Status of local soil contamination in Europe : revision of the indicator "Progress in the management contaminated sites in Europe"*. European Commission.
- Perl E.S. (2020) The limits of lead (Pb) phytoextraction and possibilities of phytostabilization in contaminated soil: a critical review. *International Journal of Phytoremediation* **22**:916–930.
- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. Whitacre DM (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer New York. New-York, pp 113–136.
- Pradeep T., Anshup (2009) Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films* **517**:6441–6478.
- Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (1999) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Springer Science & Business Media.
- Rabitsch W.B. (1995) Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. III. Arachnida. *Environmental Pollution* **90**:249–257.
- Rafeeq H., Hussain A., Aisha A., Huma Z.-E., Waqas M., Bilal M., Iqbal H., Iqbal M. (2022) Functionalized nanoparticles and their environmental remediation potential: a review. *Journal of Nanostructure in Chemistry* **12**:1007-1031.
- Rajapaksha R.M.C.P., Tobor-Kapłon M.A., Bååth E. (2004) Metal Toxicity Affects Fungal and Bacterial Activities in Soil Differently. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:2966–2973.
- Raskin I., Ensley B.D. (2000) *Phytoremediation of toxic metals*. John Wiley and Sons.
- Raskin I., Smith R.D., Salt D.E. (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8**:221–226.
- Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**:3485–3498.

- Rout G., Das P. (2003) Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie* **23**:3–11.
- Roy A., Bhattacharya J. (2012) Removal of Cu(II), Zn(II) and Pb(II) from water using microwave-assisted synthesized maghemite nanotubes. *Chemical Engineering Journal* **211–212**:493–500.
- Saibi W., Brini F. (2018) Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. *Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications*. Magliozzi (eds), pp 101–142.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. (1995) Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Bio/Technology* **13**:468–474.
- Sánchez A., Recillas S., Font X., Casals E., González E., Puentes V. (2011) Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **30**:507–516.
- Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., D’Haen J., Menthonnex J.-J., Hazemann J.-L. (2001) Accumulation Forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the Presence and Absence of EDTA. *Environmental Science & Technology* **35**:2854–2859.
- Schmöger M.E.V., Oven M., Grill E. (2000) Detoxification of Arsenic by Phytochelatins in Plants. *Plant Physiology* **122**:793–802.
- Senesil G.S., Baldassarre G., Senesi N., Radina B. (1999) Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* **39**:343–377.
- Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.K. (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**:405–412.
- Smith A.M., Gilbertson L.M. (2018) Rational Ligand Design To Improve Agrochemical Delivery Efficiency and Advance Agriculture Sustainability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **6**:13599–13610.
- Song B., Zeng G., Gong J., Liang J., Xu P., Liu Z., Zhang Y., Zhang C., Cheng M., Liu Y., Ye S., Yi H., Ren X. (2017) Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals. *Environment International* **105**:43–55.
- Srivastav A., Yadav K.K., Yadav S., Gupta N., Singh J.K., Katiyar R., Kumar V. (2018) Nano-phytoremediation of Pollutants from Contaminated Soil Environment: Current Scenario and Future Prospects. In: Ansari AA, Gill SS, Gill R, R. Lanza G, Newman L (eds) *Phytoremediation*. Springer International Publishing, Cham, pp 383–401.

- Sytar O., Kumar A., Dariusz bullet, Latowski D., Kuczyńska P., Kazimierz bullet, Strzalka K., Majeti P. (2013) Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**:985–999.
- Szynkowska M.I., Pawlaczyk A., Maćkiewicz E. (2018) Bioaccumulation and Biomagnification of Trace Elements in the Environment. Chojnacka K, Saeid A (eds) *Recent Advances in Trace Elements*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 251–276.
- Tang S.C.N., Lo I.M.C. (2013) Magnetic nanoparticles: Essential factors for sustainable environmental applications. *Water Research* **47**:2613–2632.
- Tartaj P., Morales M.P., Gonzalez-Carreño T., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J. (2011) The Iron Oxides Strike Back: From Biomedical Applications to Energy Storage Devices and Photoelectrochemical Water Splitting. *Advanced Materials* **23**:5243–5249.
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. Luch A (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Springer Basel, pp 133–164.
- Teja A.S., Koh P.-Y. (2009) Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* **55**:22–45.
- Terry N. (1983) Limiting Factors in Photosynthesis: IV. Iron Stress-Mediated Changes in Light-Harvesting and Electron Transport Capacity and its Effects on Photosynthesis in Vivo. *Plant Physiology* **71**:855–860.
- Tombuloglu H., Slimani Y., Tombuloglu G., Almessiere M., Baykal A. (2019) Uptake and translocation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and its impact on photosynthetic genes in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Chemosphere* **226**:110–122.
- Tóth G., Hermann T., Da Silva M.R., Montanarella L. (2016) Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International* **88**:299–309.
- Trujillo-Reyes J., Majumdar S., Botez C.E., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2014) Exposure studies of core–shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard? *Journal of Hazardous Materials* **267**:255–263.
- USEPA (2000) *Introduction to Phytoremediation*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.
- Van Dam N.M., Bouwmeester H.J. (2016) Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication. *Trends in Plant Science* **21**:256–265.
- Vindedahl A.M., Strehlau J.H., Arnold W.A., Penn R.L. (2016) Organic matter and iron oxide nanoparticles: aggregation, interactions, and reactivity. *Environmental Science: Nano* **3**:494–505.

- Wagner S., Gondikas A., Neubauer E., Hofmann T., von der Kammer F. (2014) Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment-Release, Behavior, and Fate. *Angewandte Chemie International Edition* **53**:12398–12419.
- Wang L., Hou D., Shen Z., Zhu J., Jia X., Ok Y.S., Tack F.M.G., Rinklebe J. (2020) Field trials of phytomining and phytoremediation: A critical review of influencing factors and effects of additives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **50**:2724–2774.
- Wang D., Kou R., Choi D., Yang Z., Nie Z., Li J., Saraf L.V., Hu D., Zhang J., Graff G.L., Liu J., Pope M.A., Aksay I.A. (2010) Ternary Self-Assembly of Ordered Metal Oxide–Graphene Nanocomposites for Electrochemical Energy Storage. *ACS Nano* **4**:1587–1595.
- Wang H., Kou X., Pei Z., Xiao J.Q., Shan X., Xing B. (2011) Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology* **5**:30–42.
- Wang Y., Wang S., Xu M., Xiao L., Dai Z., Li J. (2019) The impacts of γ-Fe₂O₃ and Fe₃O₄ nanoparticles on the physiology and fruit quality of muskmelon (*Cucumis melo*) plants. *Environmental Pollution* **249**:1011–1018.
- Wu W., He Q., Jiang C. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* **3**:397–415.
- Yang Z., Yang F., Liu J.-L., Wu H.-T., Yang H., Shi Y., Liu J., Zhang Y.-F., Luo Y.-R., Chen K.-M. (2022) Heavy metal transporters: Functional mechanisms, regulation, and application in phytoremediation. *Science of The Total Environment* **809**:151099.
- Yin W.-J., Yang J.-H., Kang J., Yan Y., Wei S.-H. (2015) Halide perovskite materials for solar cells: a theoretical review. *Journal of Materials Chemistry A* **3**:8926–8942.
- Yoon H., Kang Y.-G., Chang Y.-S., Kim J.-H. (2019) Effects of Zerovalent Iron Nanoparticles on Photosynthesis and Biochemical Adaptation of Soil-Grown *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* **9**:1543.
- Yruela I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:145–156.
- Zhang W. (2003) Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *Journal of Nanoparticles Research* **5**:323–332.
- Zhang Y., Chen Y., Westerhoff P., Hristovski K., Crittenden J.C. (2008) Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. *Water Research* **42**:2204–2212.
- Zhu H., Han J., Xiao J.Q., Jin Y. (2008) Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* **10**:685–784.
- Zia-ur-Rehman M., Naeem A., Khalid H., Rizwan M., Ali S., Azhar M. (2018) Responses of Plants to Iron Oxide Nanoparticles. In: *Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms*. Elsevier, pp 221–238.

CHAPITRE 2. Démarche générale

1. Démarche (stress hydrique)

Comme vu dans la section 1.4 du chapitre précédent, ces travaux de thèse se sont organisés autour de deux expérimentations principales qui sont présentées dans les chapitres 3 et 4 de ce manuscrit. Une première visant à étudier l'impact des nanoparticules de magnétite sur le comportement et le devenir du plomb dans un système eau-sol-plante ; ainsi que leur potentiel participation à l'amélioration de la phytoextraction par le tournesol. Et une seconde, similaire à la première, qui utilise cette fois-ci un mélange de 5 ETs fréquemment retrouvés dans les sols : l'As, le Cd, le Cu, le Pb et le Zn.

Nous avons également combiné ces expérimentations avec des périodes de carence hydrique afin d'induire de légers stress hydriques chez les plantes. Ce choix s'inscrit dans un contexte de changement climatique avec des phénomènes de sécheresse de plus en plus récurrent. La lecture de la littérature montre qu'en cas de stress hydrique les NPs permettent d'induire chez les plantes (1) une amélioration de la germination et de la croissance des plantules, (2) une accumulation d'osmolytes, pigments photosynthétiques et activation du système métabolique, et (3) la modulation de l'expression de gènes répondant au déficit hydrique (Kandhol *et al.* 2022). Plus précisément, dans le cas des NPs d'oxydes de fer des études ont montrés des résultats prometteurs. Dans leurs travaux, Martínez-Fernández *et al.* (2015) montrent que l'apport de NPs d'oxydes de fer induisent une augmentation de proline, acide aminé marqueur du stress hydrique, chez le tournesol en condition de pollution au Cd après l'application d'un stress hydrique de 8 jours. De même, Adrees *et al.* (2020) observe une diminution de la production d'espèce réactives de l'oxygène chez le blé en condition de pollution au Cd après traitement aux NPs d'oxyde de fer. Ainsi, nous avons souhaité ajouter ce paramètre supplémentaire à nos travaux afin d'observer si nous obtenions des réponses similaires. Il aurait été idéal d'y dédier une expérimentation spécifique mais par manque d'espace et de temps nous avons opté pour la combiner avec les deux principales en optant pour des mesures de caractérisation simples n'entravant pas notre objectif principal.

Nous avons choisi de réaliser des cultures en sol sur une longue durée car ce type d'étude est minoritaire dans la littérature. Le choix du modèle biologique s'est porté sur le tournesol car c'est une plante qui produit une biomasse importante, dispose d'un fort développement racinaire, avec une capacité à absorber divers ETs, faisant ainsi de cette plante

une espèce intéressante à des fins de phytoremédiation. De plus, le tournesol possède une tolérance élevée aux périodes de stress hydrique.

2. Synthèse en laboratoire des nanoparticules de magnétite

Les nanoparticules de magnétites utilisées pour ces travaux de thèse ont été synthétisées dans notre laboratoire selon la méthode décrite par Jungcharoen *et al.* (2021). Les nanomagnétites sont obtenues en conditions anaérobies par co-précipitation de sels ferreux et de sels ferriques (ratio molaire 1:2) dans une solution de NaOH 0,5M (**Figure 1**). Après la synthèse la phase solide est lavée deux fois avec de l'eau ultrapure, et le pH est ajusté à 8,5 (*il sera ajusté à 7 par la suite juste avant l'ajout des NPs dans le sol afin de ne pas influencer sur le pH du sol et le développement des plantules*). La solution finale consistait en une magnétite non stœchiométrique $Fe_{3-\delta}O_4$ avec un rapport Fe(II)/Fe(III) compris entre 0,15 et 0,1. Les NPs synthétisées sont ensuite caractérisées selon les méthodes décrites dans Demangeat *et al.* (2020). Notre mode de synthèse permet ainsi d'obtenir des particules sphériques de 9 ± 2 nm de diamètre avec une surface spécifique et un pH_{zpc} respectivement de $115\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ et 6,2 (**Figure 1**).

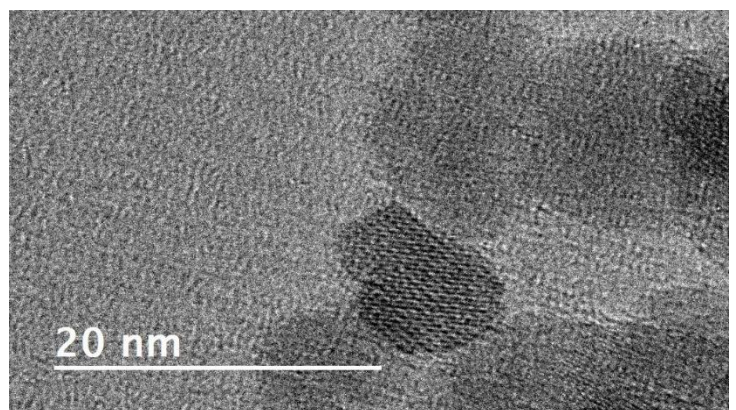


Figure 1 : Synthèse des nanoparticules de magnétite (gauche) et image MET de nanomagnétites (droite).

3. Choix du sol et historique

Le sol utilisé pour les expérimentations menées au cours de ces travaux de thèse a été collecté sur une parcelle de l'université (Coordonnées GPS 48.118458, -1.639252). Ce sol se trouve en milieu urbain mais est dépourvu d'activité anthropique depuis plusieurs dizaines d'années (**Figure 2**). Le sol a été prélevé entre le premier horizon de 10 à 20 cm de profondeur, homogénéisé puis tamisé à 5mm de diamètre. La caractérisation du sol a été confiée au laboratoire d'analyse LABOCEA de Combourg et les résultats sont donnés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

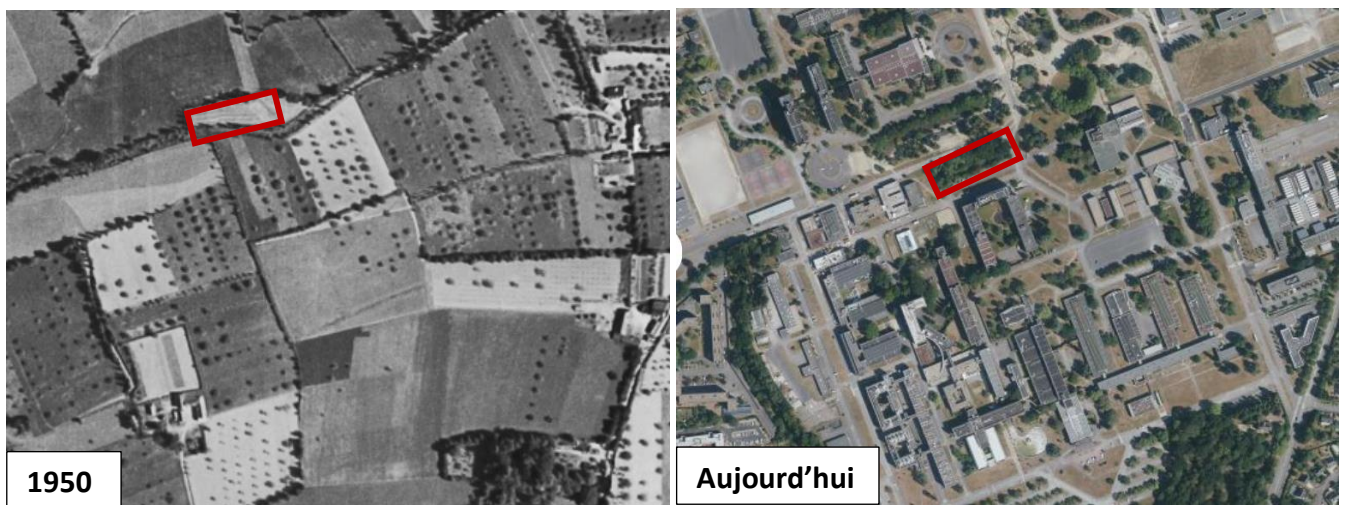


Figure 2 : Photographie aérienne du site de prélèvement avant (gauche) et après urbanisation (droite) de la zone (<https://remonterletemps.ign.fr/>).

La caractérisation élémentaire du sol a également été réalisée par le service Roches et Matériaux du laboratoire SARM à Vandoeuvre-lès-Nancy (France) et sont données dans les annexes des chapitres 3 (Annexe 1) et 4 (Annexe 2).

Tableau 1 : Caractérisation physicochimique du sol

pH eau	6,08
CEC (mEq .100g ⁻¹)	12,6
Matière organique (%)	4,2 %
Classe texturale	Limoneux
Argiles (%)	15,6
Limons fins (%)	22,6
Limons grossiers (%)	15,7
Sables fins (%)	27,4
Sables grossiers (%)	18,7
Terres fines (%)	98,8

4. Design expérimental

Pour mener à bien nos travaux, nous avons mis au point un dispositif de culture simple permettant à la fois d'analyser les lessivas de solution de sol en cours d'expérimentation, le sol et les plantes. Ce dispositif est illustré en **Figure 3**. Il consiste en deux pots de type béccher (volume 400 mL) en polypropylène imbriqués l'un dans l'autre. Le pot du dessus est percé pour permettre à la solution de sol de s'écouler, puis recouvert d'une filtre nylon de 30 µm afin de retenir un maximum de particules du sol. Cette taille permettait de manipuler les systèmes de culture aisément sans entraver le développement des plantes. Ce dispositif a été utilisé pour l'ensemble des expérimentations présentées.

De façon générale, pour les travaux présentés dans les chapitres 3 et 4, les cultures expérimentales ont durées 90 jours. Chacune des deux expérimentations menées comporte :

- (1) des sols témoins correspondant au sol prélevé sur site sans traitement ;
- (2) des sols traités avec un ou plusieurs ETs sélectionnés ;
- (3) des sols traités avec un ou plusieurs ETs additionnés de NPs de magnétite à hauteur de 1% du poids du sol sec selon les recommandations dans la littérature lorsqu'elles sont utilisées en remédiation (Komárek *et al.* 2013) ;

(4) des sols traités avec un ou plusieurs ETs additionnés de magnétite de taille micrométrique (1%) servant de contrôle par rapport aux nanomagnétites ;

(5) dans le chapitre 4 une modalité supplémentaire est ajoutée contenant des sols traités avec plusieurs ETs additionnés de nanomagnétites enrobées à l'acide citrique (1%). Ce choix a été fait car l'enrobage des NPs à l'acide citrique modifie les propriétés physico-chimiques de surface ce qui permet d'augmenter leur stabilité colloïdale en réduisant l'agrégation, d'augmenter la diffusion en milieu poreux et les mécanismes d'adsorption. De plus, l'ajout d'acide citrique est également connu pour améliorer la croissance et la biomasse des plantes ainsi que pour réduire la phytotoxicité des ETs (Farid *et al.* 2017; Bhat *et al.* 2022).

Des lessivages des sols ont été réalisés toutes les semaines (chapitre 3) ou deux semaines (chapitre 4) avec de l'eau déionisée. Durant toute l'expérimentation nous avons suivi l'état physiologique des plantes (*e.g.* taille, nombre de feuille, efficacité photosynthétique) puis les sols et les différentes parties végétales (feuilles, tiges, bourgeons, racines) ont été récoltées afin de réaliser des analyses physico-chimiques, biochimiques ainsi que l'analyse des teneurs en ETs.

De plus, les dispositifs sont maintenus à la capacité au champ par arrosage avec une solution de NaCl 0,5 mM afin de reproduire une force ionique similaire à l'eau de pluie ($i=0,001$ à $0,005$ M). Au total chaque système reçoit entre 0,001 g et 0,005 g de NaCl, qui sont en partie lessivés à chaque phase de lessivage. Une carence hydrique (acquise par absence d'arrosage) a également été appliquée 3 jours sur 7 chaque semaine à chaque plante.

Pour chacune des expérimentations des protocoles détaillés sont donnés dans les chapitres 3 et 4.

- ① Toile en nylon
- ② Trous dans le pot supérieur
- ③ Ecoulement de l'eau
- ④ Sol avec traitement

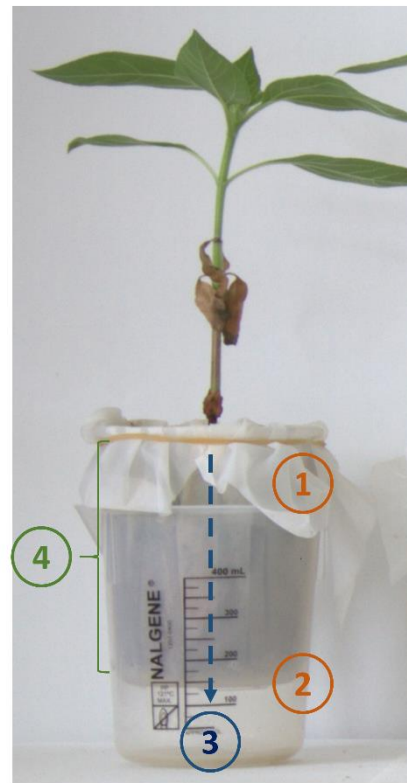


Figure 3 : Photographie du dispositif expérimental.

Bibliographie

- Adrees M., Khan Z.S., Ali S., Hafeez M., Khalid S., ur Rehman M.Z., Hussain A., Hussain K., Shahid Chatha S.A., Rizwan M. (2020) Simultaneous mitigation of cadmium and drought stress in wheat by soil application of iron nanoparticles. *Chemosphere* **238**:124681.
- Bhat J.A., Bhat M.A., Abdalmegeed D., Yu D., Chen J., Bajguz A., Ahmad A., Ahmad P. (2022) Newly-synthesized iron-oxide nanoparticles showed synergetic effect with citric acid for alleviating arsenic phytotoxicity in soybean. *Environmental Pollution* **295**:118693.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Davranche M., Cabello-Hurtado F. (2020) Surface modifications at the oxide/water interface: Implications for Cu binding, solution chemistry and chemical stability of iron oxide nanoparticles. *Environmental Pollution* **257**:113626.
- Farid M., Ali S., Rizwan M., Ali Q., Abbas F., Bukhari S.A.H., Saeed R., Wu L. (2017) Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morpho-physiological and biochemical alterations in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**:90–102.
- Jungcharoen P., Pédrot M., Choueikani F., Pasturel M., Hanna K., Heberling F., Tesfa M., Marsac R. (2021) Probing the effects of redox conditions and dissolved Fe²⁺ on nanomagnetite stoichiometry by wet chemistry, XRD, XAS and XMCD. *Environmental Science: Nano* **8**:2098–2107.
- Kandhol N., Jain M., Tripathi D.K. (2022) Nanoparticles as potential hallmarks of drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* **174**:e13665.
- Komárek M., Vaněk A., Ettler V. (2013) Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – A review. *Environmental Pollution* **172**:9–22.
- Martínez-Fernández D., Vítková M., Bernal M.P., Komárek M. (2015) Effects of Nanomagnetite on Trace Element Accumulation and Drought Response of *Helianthus annuus L.* in a Contaminated Mine Soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**:101.

CHAPITRE 3

Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur le comportement et devenir du plomb dans le sol et sur l'amélioration de la phytoremédiation.

Ce chapitre a été publié en tant qu'article de recherche dans la revue *Environmental Science : Advances* en mars 2023. Citer comme suit : L. Mounier, M. Pédrot, M. Bouhnik-Le-Coz and F. Cabello-Hurtado, *Environmental Science: Advances*, 2023, **2**, 767–779.

(DOI : 10.1039/d2va00283c)

Impact of iron oxide nanoparticles on a lead polluted water-soil-plant system under alternating periods of water stress

Léa Mounier^{a,b}, Mathieu Pédrot^b, Martine Bouhnik-Le-Coz^b, Francisco Cabello Hurtado^{a*}

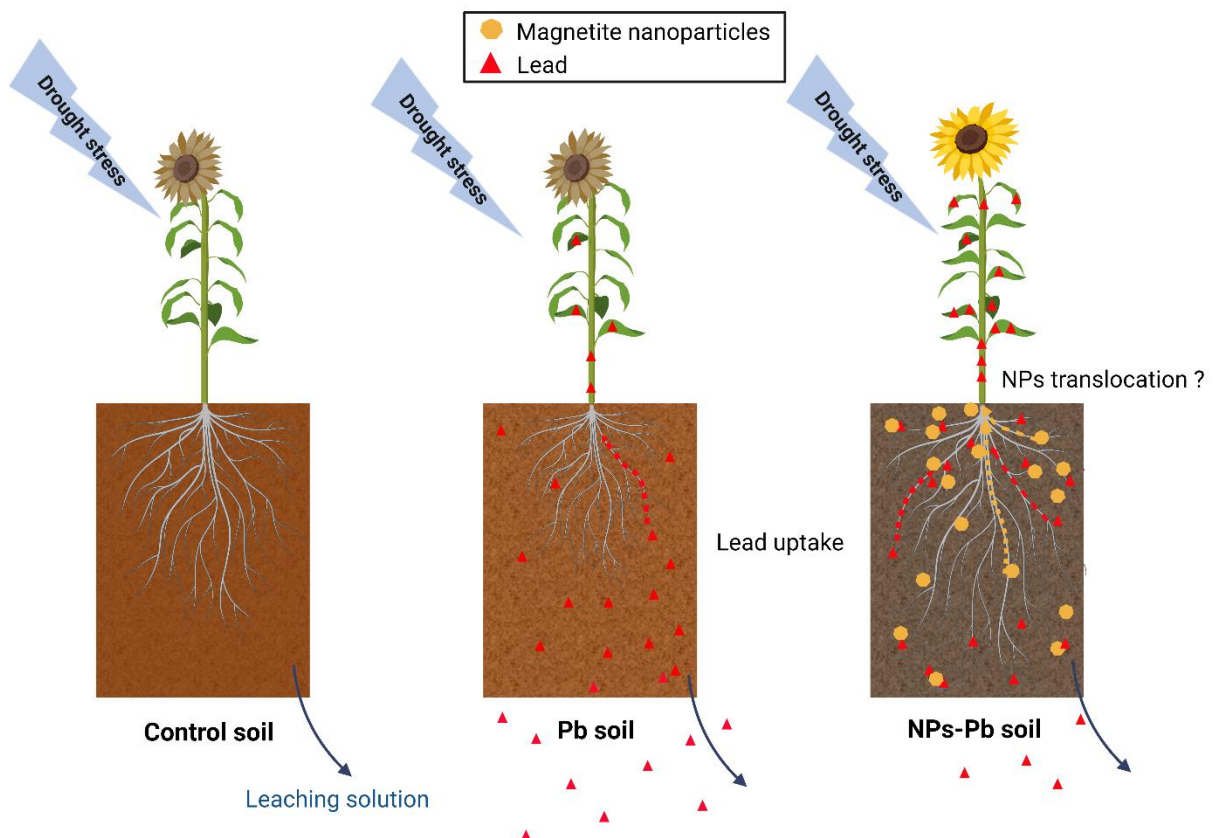
^aUniv Rennes 1, CNRS, ECOBIO, UMR 6553, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

^bUniv Rennes 1, CNRS, Géosciences Rennes, UMR 6118, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

* Corresponding author. Phone: +33 2 23235022. Email: francisco.cabello-hurtado@univ-rennes1.fr

Environmental significance

Many sites are contaminated with lead for which several types of remediation systems have been tested. Phytoremediation is one of these methods, environmentally friendly but slow, which we tried to improve with the addition of iron oxide nanoparticles. Indeed, magnetite nanoparticles, known for their high sorption capacity, can be used to act on Pb dynamics. This long-term study investigated the potential of magnetite nanoparticles for lead remediation in a complete cultivation system including water, soil and plant compartments. Influencing Pb mobility and impacting both soil, leached soil solution and plants, the findings result shows that magnetite nanoparticles are promising materials for trace elements phytoremediation and plant stress tolerance, allowing to associate a decrease of Pb mobility in leachates while increasing its bioavailability.



Abstract

Iron oxide nanoparticles (IONPs) are a promising material for the remediation of trace elements which are a significant source of soil pollution. Thus, as part of improving phytoremediation processes, the addition of IONPs to soil was tested in this study. A long-term experiment was performed in pot to assess the potential of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles (NPsMagn) to modify lead (Pb) availability to sunflower (*Helianthus annuus*) and its behavior in a water-soil-plant system under repeated water-deficiency stress. Plants were grown either in control soil, Pb polluted soil (final added lead 375 mg kg^{-1}), Pb polluted soil containing 1 % dry weight NPsMagn or Pb polluted soil containing 1 % dry weight micro-sized magnetite for 90 days. Pb polluted soil and Pb treated soil containing NPsMagn do not affect plant growth but NPsMagn allow reduced oxidative impact as a decrease in lipid peroxidation was observed in their presence. Magnetic susceptibility measurements and Fe content in sunflower plants and leachates suggest that NPsMagn penetrate the roots but are not dispersed in soil solution. In addition, Pb content increased by 102 % and 22 % respectively in leaves and stems of plants treated with NPsMagn. Based on Pb content in soil solutions, NPsMagn decrease Pb in leachate by 50 %. During water stress periods, NPsMagn significantly improve water retention in soil and relative water content in plants. As a result of this, NPsMagn improve Pb availability and accumulation in sunflower plants in TEs contaminated soils unfavorable to plant growth. This study also highlights favorable effects of NPsMagn on Pb stabilization into soil, reducing their loss in leachates and on plant tolerance during water stress periods.

1. Introduction

Due to human activities, trace element (TE) pollution has become widespread and constitutes a threat to the environment and human health. Several million tons of TEs have been released into the environment during the last century (Singh *et al.* 2003), spreading TEs at the worldwide level even in remote ecosystems (Senesil *et al.* 1999). Among these TEs, lead (Pb), mainly resulting from mining production, industries and transport, is one of the ubiquitously distributed most abundant toxic elements in soil and water without biological function (Kushwaha *et al.* 2018). In the last decades, an estimated 783,000 tons of Pb have been dispersed in the environment worldwide (Singh *et al.* 2003).

Through its bioaccumulation and nonbiodegradability, Pb soil contamination may cause significant hazard to human being, animals and plants (Kumar *et al.* 2020). Lead has a strong effect on plants because it may impact all aspects of plant growth and health even at very low Pb concentration (Perl 2020). Plant germination has been shown to be inhibited (Islam *et al.* 2007) and biomass production of roots and aerial parts may also be affected up to half (Islam *et al.* 2007; Hadi *et al.* 2010; Chauhan *et al.* 2020). Furthermore, Pb also impacts the metabolism of plants (e.g. decreasing photosynthetic activity, protein content, nutrient uptake, respiration rate and ATP content; or increasing lipid peroxidation and oxidative stress) (Pourrut *et al.* 2011). ROS production caused by Pb toxicity may lead to oxidative stress, which is widely identified as an indicator of plant stress and may lead to cell death (Keunen *et al.* 2011; Kumar & Prasad 2018). In some cases, Pb and TEs in general can be translocated from plants to the human dietary system posing a major threat to human health (Natasha *et al.* 2021). Therefore, it has become necessary to take proactive measures to detoxify the Pb-polluted soils.

Nanotechnology is an emerging field that covers a wide range of technologies currently being developed at the nanoscale. Among them, environmental nanotechnologies have enormous potential to provide innovative solutions to a wide range of environmental problems. These include improved methods for pollution abatement, water treatment, environmental sensing and remediation, and making alternative energy sources more cost-effective. The unique properties (e.g. small size, high surface area) of engineered nanomaterials enable these new technologies to address environmental challenges in a sustainable manner. The main objective of environmental nanotechnology also includes the safe design of nanomaterials

with potential environmental benefits and the promotion of sustainable development of these materials (Latif *et al.* 2020; Rizwan *et al.* 2021). NPs such as iron oxide nanoparticles (IONPs) can interact with pollutants in soils and soil solutions, such as heavy metals, pesticides or other contaminants, and are promising materials for the stabilization of TEs (Claudio *et al.* 2017). For instance, IONPs has been applied for scavenging pollutants such as nitrate (Jiang *et al.* 2011), antibiotic medication (Chen *et al.* 2012), or TEs such as Cr(VI) (Alidokht *et al.* 2011), Cd(II) (Boparai *et al.* 2011), As(V) (Zhu *et al.* 2009), Se (IV) (Liang *et al.* 2013), and Pb(II) (Zhang *et al.* 2011) from the aqueous media. Due to their high surface area, which promotes an elevated sorption capacity, IONPs can impact mobility, availability and toxicity of TEs and in particular they limit the transport of Pb and the contamination of groundwater in case Pb is neither absorbed by roots nor by soil particles (Komárek *et al.* 2013). Thus, IONPs effectively scavenge TEs and limit their transport through chemical mechanisms involving adsorption (both physical and chemical) (Tang *et al.* 2003; Auffan *et al.* 2008), incorporation, and electron transfer (e.g. reduction of As(V) to As(III)(Borch *et al.* 2010)) (Rahman *et al.* 2022). For instance, Demangeat *et al.* (2020) observed that increased Cu adsorption into IONPs was related to pH augmentation, which caused decreasing protons concentration at magnetite surface favoring cation attraction. Under certain conditions, IONPs have been shown to decrease the toxicity of some TEs by decreasing their availability to plants (Martínez-Fernández *et al.* 2015). An amendment of IONPs significantly reduced soluble Zn in the soil solution by 22 %, demonstrating that IONPs acted by fixing Zn in the soil (Martínez-Fernández *et al.* 2015).

In addition, the presence of IONPs could both influence the absorption and accumulation of TEs in plants, as well as enhance plant growth through improved nutrition and fertilization (Kah *et al.* 2019; Rahman *et al.* 2022). Studies showed that NPs could enhance the plant capacity to absorb more nutrients and increase efficiency of NPK use (Dimkpa *et al.* 2017). Also, organic matter (OM) can bound with IONPs (e.g. through hydrogen bounding, cation bridges and van der Waals interactions) and thus IONPs increase OM amount due to its high surface area (Claudio *et al.* 2017). Iron availability for plant growth is also under control of Fe solubilization from iron-rich minerals. This nutrient exchange is mediated by chemicals (pH and dissolution-precipitation) and biological (e.g. roots exudates release) processes. Even if it

has been demonstrated that IONPs have limited penetration into plants, they aggregate onto roots surface (Ma *et al.* 2010). Accumulation of IONPs on roots could allow to increase bioaccumulation of associated Pb. However, the processes underlying NP-mediated TEs uptake and toxicity reduction vary with NPs type, mode of application, time of exposure and plant conditions (e.g. species, varieties, and development rate) (Rizwan *et al.* 2021). Current researches are testing the use of IONPs to reduce the phytotoxicity caused by toxic TEs (Rui *et al.* 2016; Konate *et al.* 2017; Fahad *et al.* 2020) and improve plant growth (Rui *et al.* 2016; Palmqvist *et al.* 2017).

Thus, IONPs might be used in combination with plants for remediating soils contaminated by TEs but, to take advantage of the potential of IONPs for remediation, issues concerning IONPs availability, biocompatibility and behavior in soil and soil solution need to be further investigated. Sunflower (*Helianthus annuus*) was selected for the current study as it has a high biomass production and has a promising phytoremediation potential due to its high ability to adsorb, stabilize and accumulate different concentrations of Pb (Chauhan & Mathur 2018) as well as a tolerance to periods of water stress (Karam *et al.* 2007). In this context, the objectives of the experiment were to (i) study the impact of both IONPs and Pb concerning their behavior in a water-soil-plant system, (ii) assess Pb phytoextraction potential by sunflower treated with IONPs, (iii) evaluate the plant-protection capacities of IONPs under Pb pollution.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles

Iron oxide nanoparticles, namely magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles (NPsMagn), have been synthesized following co-precipitation method (Massart 1981; Demangeat *et al.* 2018) in aerobic condition, and presented size and surface area as in Demangeat *et al.* (2020) A solution of FeCl_2 and FeCl_3 (1:2 molar ratio) was mixed into NaOH solution leading to precipitation of magnetite particles, and solid phases were washed with ultrapure water. The final solution consisted of a non-stoichiometric magnetite $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ with a $\text{Fe}_{\text{II}}/\text{Fe}_{\text{III}}$ ratio between 0.15 and 0.1 determined by spectrophotometric method as described by Jungcharoen *et al.* (2021). The size, shape, surface area and pH_{zpc} of NPsMagn were determined according to the methods

described in Demangeat *et al.* (2020). Thus, the synthesized NPsMagn have a round crystalline shape of 9 ± 2 nm diameter (ESI Figure S1) with a specific surface area and pH_{zpc} respectively established at $115 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and 6.2. A micrometer-sized magnetite (particles $< 5 \mu\text{m}$) (μMagn) solution was prepared by diluting magnetite (310069 Sigma-Aldrich) in ultrapure water to the desired concentration.

2.2. Experimental design

A 90-day culture was performed with sunflower (*Helianthus annuus*) plants. The experimental set-up consisted of two nested pots (400 mL polypropylene beaker, Nalgene). The top pot contains the soil (335 g dry weight (DW) per pot) and a nylon cloth (31 μm diameter) was added to the bottom of the top pot to hold the soil particles in the higher part of the system. The top pot was pierced to allow soil solution to run out and be collected in a second pot (ESI Figure S2). The soil used was collected on grove-type site between the 10 to 20 cm-deep first horizon, homogenized and sieved to 5 mm diameter. Soil elemental composition were carried out (ESI Table S1) and the initial content in Pb determined (53.8 mg kg^{-1} DW).

Four treatments of six replicates have been constituted for plant cultivation: unmodified soil (Control), soil polluted with added Pb (Pb), soil polluted with added Pb and containing 1 % NPsMagn (NPsMagn-Pb) and soil polluted with added Pb and containing 1 % of micrometer-sized magnetite ($\mu\text{Magn-Pb}$). In addition, Pb and NPsMagn-Pb treatments (three replicates each) have also been studied without plants (Soil Pb and Soil NPsMagn-Pb, respectively). The soil has been initially contaminated with added lead at a concentration of 150 mg kg^{-1} of dry soil by adding 50 mL per pot of 4.85 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ into pristine soil and homogenized. This concentration is above toxicity threshold set in France (Journal Officiel République Française 1998) and corresponds to the toxicity limit in *H. annuus* found in literature (Chauhan *et al.* 2020). Three new additions of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ corresponding to 75 mg Pb per kg soil each (at days 35, 42 and 49) brought the final added lead concentration to 375 mg kg^{-1} soil. NPsMagn solution (23 g L^{-1}) has been added to achieve 1 % (m/m) of dry soil to provide a consistent amount of material to achieve an optimal removal of TEs in soil according to Komárek *et al.* (2013). Likewise, micrometer-sized magnetite solution (25 g L^{-1}) has been added into soil up to 1 % (m/m) of dry soil and homogenized.

Sunflower seeds were washed 3 minutes in a 3 % sodium hypochlorite bath and then rinsed five times during 12 minutes in distilled water baths. Seeds were first sown into pristine soil and placed in a climatic chamber. After 18 days of growth, young plants with the same state of growth were transplanted in experimental set-up. Cyclic growth parameters of climatic chamber allowed 16 h light at 21 °C and 8 h dark at 18 °C, a photosynthetic photon flux density of 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a relative humidity of 70 %.

Each week, soils were kept at field capacity with 0.5 mM NaCl solution during 4 days, followed by a period of 3 days of water deficit (absence of irrigation). Once a week, soil solution has been harvested by increasing the watering. For pots cultivated with plants, soil solutions collected from the six replicates were mixed two by two and homogenized at each sampling allowing to obtain a sufficient volume so that three samples per treatment were generated for geochemical analyses. In the case of the soil solutions of non-cultivated pots, two samples were generated by dividing soil solution of the second pot in two halves and then each half was homogenized with soil solution of pots 1 and 3 respectively.

After 90 days of culture, plants were harvested for biological analyses. Pictures were taken, and the fresh weights of roots, leaves and stem were measured for each individual (if flower buds were present they were counted with the leaves). Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For NPsMagn-Pb treatment, roots and stem/leaves have been vertically divided into three parts of equal length to assess the presence of NPsMagn into plants thanks to magnetic susceptibility measurement. Soil for each replicate was also collected and separated in three equal vertical parts for the purpose of magnetic susceptibility measurements. For aerials parts, the 3 sections were named from bottom to top: "L1" (lower third), "L2" (mid third) and "L3" (upper third) for leaves (T1, T2 and T3 for stem). Similarly, roots (R1, R2 and R3) and soil (S1, S2, S3) parts were numbered from 1 to 3 with increasing depth.

2.3. Biological assays

In order to perform biological analyses, plant samples were first dried by lyophilization (Christ ALPHA 1-2LDplus) and then grinded by mill (Mixer Mill MM400). Frozen samples were placed into the chamber for a primary long drying (0.09 Pa for 72h), followed by a secondary short

drying stage (0.001 Pa for 24h). Dried vegetative samples were grinded using zirconium bowls and beads.

2.3.1. Pigment content

To determine chlorophyll and carotenoid contents, 5 mg DW of *H. annuus* leaves were added to 500 µL of acetone 80 %, mixed 10 min at 4 °C and incubated in the dark 12 h at 4 °C. After complete bleaching, samples were centrifuged at 12 000 *g*. Supernatants were recovered in new tubes, and 30 µL of each were diluted in 270 µL acetone (80 %) in microplate wells. Pigment content was measured by spectrophotometrically reading the absorbance at 470, 645 and 663 nm (spectrometer SAFAS FLX-Xenius). Pigment content was then determined based on the equations of Lichtenthaler and Wellburn (1983).

2.3.2. Amino acid content

To determine amino acid content, total amino acids were first extracted with 30 mg dried leaves added with 1 mL ethanol (100 %) and heated at 95 °C for 10 min with opened caps to allow ethanol to evaporate, and then added with 1 mL ultra-pure water and centrifuged at 10 000 *g* for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and stored at -20 °C.

Determination of total amino acids was performed following Yemm *et al.* (1955) method, improved by Magné and Larher (1992). 100 µL of amino acids extract were added with 0.5 mL citrate buffer (177 mM, pH 4.6 containing 300 mM sodium hydroxide) and 1 mL of ninhydrin solution (47 mM ninhydrin, 50 mM ascorbic acid, ethanol (70 % v/v)) and heated at 95 °C for 20 min. 3 mL ethanol (70 %) were added and absorbance at 570 nm was measured by spectrophotometry in glass tank. Leucine was used to determine the amino acid contents (calibration solution range from 0 to 10 mM).

Determination of proline content was performed following Troll and Lindsley (1955) method. 100 µL of amino acids extract were added with 1 mL of ninhydrin solution (6 mM ninhydrin, acetic acid (60 % v/v)) and heated at 95 °C for 20 min. Samples were cooled in water for 15 min, added with 3 mL of toluene and placed 1 h in the dark. After phase separation, the top solutions were slightly poured into a glass tank and absorbance was measured at 520 nm.

2.3.3. Determination of lipid peroxidation

Quantification of lipid peroxidation products is achieved by measurement of thiobarbituric acid reactant species (TBARS) according to the corrected method proposed by Hodges *et al.* (1999) 15 mg dried leaves were added with 1 mL ethanol (80 %) and let react for 25 min in a rotation wheel at room temperature. After centrifugation for 10 min at 10 000 *g*, supernatants were collected in new tubes. Two aliquots of 200 μ L were prepared and added with 200 μ L of TBA+ solution (20 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.65 % (w/v) TBA and 0.01 % (w/v) butylhydroxytoluene). Two others aliquots were mixed with TBA- solution (20 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.01 % (w/v) butylhydroxytoluene). Samples were heated at 95 °C for 25 min then centrifuged for 10 min at 10 000 *g* after cooling at room temperature. Supernatants were recovered in new tubes, and 300 μ L were placed in microplate wells. Supernatant absorbance was measured at 440, 532 and 600 nm (spectrometer SAFAS FLX-Xenius) and results were expressed in malondialdehyde equivalents (MDAeq) per gram of plant DW according to Hodges *et al.* (1999) equations.

2.3.4. Soluble protein extraction and quantification

For soluble protein extraction, 50 mg dry leaves were added to 1.5 mL sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) containing 1 mM Na-EDTA, 5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma-P9599) and 0.1 % (w/v) Triton X-100. Samples were shaken during 1 h at 4 °C, then centrifuged twice at 12 000 *g* for 12 min and supernatants were collected in new tubes. Soluble protein quantification was performed according to Bradford's method by spectrophotometric determination (Bradford 1976). Bovine serum albumin (BSA) was used to determine the protein contents (calibration solution range from 0.1 to 1.4 mg L⁻¹). Protein extracts were kept at -80 °C until used for POD and SOD enzymatic antioxidant activity assays.

2.3.5. Determination of POD activity

Guaiacol peroxidase (POD) activity was determined based on some modified literature (Cakmak & Marschner 1992). Reaction occurs in microplate well where reaction mixture consists of 190 μ L deionized ultrapure water, 30 μ L potassium phosphate buffer (1 M, pH 6.5), 30 μ L guaiacol (150 mM) and 50 μ L soluble protein extract. Reaction was triggered by addition of 30 μ L of H₂O₂ (160 mM) and monitored by reading absorbance at 470 nm ($\epsilon_{\text{tetraguaiacol}} = 26.6$

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) for 6 min. The observed increase in absorbance provided the maximum rate of tetraguaiacol formation and was used to determine the enzymatic activity. The amount of enzyme that reduced 1 mmol of H_2O_2 per min corresponds to 1 unit (U) of POD under the assayed conditions.

2.3.6. Determination of SOD activity

The capacity of superoxide dismutase (SOD) to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) was measured following the modified method of Giannopolitis and Ries (1977). Each microplate well was filled with 175 μL deionized ultrapure water, 30 μL potassium phosphate buffer (500mM, pH 7.8), 30 μL of methionine (130 mM), 30 μL of NBT (750 μM) and 5 μL of soluble protein extract. Two microplates were prepared, one exposed to light and one kept in the dark (for light-independent reactions corrections) for spectrometric analysis. A pre-reading of each plate was realized at 560 nm before initiating the reaction. Then, 30 μL of riboflavin (20 μM) was added in each well to start the reaction and samples were exposed either to light (30 min) or kept in the dark. The absorbance was measured at 560 nm, and pre-read values were subtracted from the final absorbance measurement. SOD activity has been expressed in U mg^{-1} protein, "U" corresponding to the amount of enzyme causing 50 % inhibition of the NBT reduction to blue formazan observed in the absence of the enzyme.

2.4. Leaf angle measurement

Photos used for the measurement of leaf angle were taken twice a week at the beginning and the end of water stress periods. Leaf inclination angle was measured using the ImageJ software and corresponds to the angle between the abaxial face of the leaf and the petiole (measurements were made on four leaves per plant).

2.5. Relative water content

To determine relative water content (RWC), 10 leaf discs (1 cm diameter) were collected and fresh weights (FW) were measured. Leaf discs were immersed for 24 h in distilled water and then turgescent weights (TW) were assessed. Leaf discs were heated at 70 °C for 48 h and the DW were determined. The RWC was evaluated following the equation: $\text{RWC} = ((\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})) \times 100$.

2.6. Geochemical analyses

The pH was measured with a combined Mettler InLab electrode after a calibration performed with 3 standard buffers (pH 4, 7, and 10). The redox potential was measured with a Pt electrode combined with a Ag/AgCl reference electrode (Fisher Scientific Bioblock). The Eh values are presented in millivolts relative to the standard hydrogen electrode, including a correction measurement using a commercial redox buffer (220 mV vs Ag/AgCl). Soil solutions have been filtered at 0.2 μm with syringe filters to remove particles. 10 mL of the filtered soil solutions were directly acidified by subboiled nitric acid (HNO_3 ; 14.6 N) at 2 % v/v for ICP-MS analysis, the remainder were placed at 4 °C.

2.6.1. Trace elements measurements

Lead and iron concentrations were determined by ICP-MS (Agilent 7700x) using rhenium and rhodium as internal standards. The international geostandard SLRS-6 was used to check the validity and reproducibility of the results. Typical uncertainties including all error sources were below $\pm 5\%$ for Fe and Pb. Samples were prepared in clean room and tubes were pre-washed (24 h in 1.5 M HNO_3 at 45 °C, 24 h in deionized ultrapure water at 45 °C).

For biological samples, 100 mg plant DW were added with 5 mL 14.6 N subboiled HNO_3 , 1 mL 37 % H_2O_2 and 1 mL ultrapure water in specific digestion tubes (Anton Paar Teflon 18 mL vials). Samples were digested using a multiwave (Multiwave 7000 Anton Paar) using a specific program. First step consists of increasing temperature to 250 °C for 20 min at 140 bars, then temperature is kept at 250 °C for 30 min at 140 bars. Next, the digested solutions were transferred into digestion vessels (Savillex Teflon vials) and were heated until evaporation of the solvent. Samples were solubilized in 0.37 M subboiled HNO_3 with appropriate dilution(s) considering ICP-MS quantification limits.

2.6.2. Determination of dissolved organic carbon

Amount of dissolved organic carbon (DOC) was determined with a Total Organic Carbon Analyzer (TOC-L SHIMADZU). The accuracy of DOC measurement was estimated at $\pm 3\%$ (respectively by using standard solution of potassium hydrogen phthalate).

2.6.3. Determination of soil water potential

The soil water potential was determined by a WP4C dew point meter (METER Group, Inc). The measurements were performed on soil taken after plant harvest in each treatment. Same amount of soil was filled in the WP4C sample cup and placed in the block chamber of WP4C for measurement.

2.7. Magnetic susceptibility measurements

In order to evidence magnetite presence in environment, magnetic susceptibility has already been used (Demangeat *et al.* 2021). Here magnetic susceptibility measurements were conducted to track and quantify NPsMagn in different parts of sunflower plants and in soil. Analyses were performed with a magnetic susceptibility meter (Kappabridge AGICO KLY3).

To perform the measurements, samples were dried by lyophilization and stored in clean plastic containers. To account for the container signal, blanks (containers without samples) were used at the beginning and end of the acquisitions and after every 10 measurements. To ensure the validity and reproducibility of the results, magnetic susceptibility measurements were repeated 12 times for each sample. Then mass susceptibilities ($\text{m}^3 \text{kg}^{-1}$) were calculated considering samples weight. From these values, NPsMagn concentration into the samples was determined based on the blank-corrected magnetic susceptibility of a sample of NPsMagn of known weight.

2.8. Statistical analysis

Each value is presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM), with at least 3 replicates. Normality was confirmed with Shapiro test and homoscedasticity with Bartlett test for each assay. Statistical analyses were conducted using the Tukey test (ANOVA) or Kruskal Wallis test to assess the significance of the means taking $p < 0.05$ as significant. Data significantly different are indicated with different letters.

3. Results and discussion

3.1. Physiological and biochemical responses of *Helianthus annuus* plants exposed to NPsMagn in a Pb pollution context

3.1.1. Growth parameters

After 90 days of plant growth, no significant difference was observed for either leaves or stems dry weight (**Figure 1**) and plant height (averaged 55 cm, data not shown) between control plants and plants submitted to any of the treatments.

Even if NPsMagn-Pb treatment did not promote a significant increase in aerial biomass, our results show the harmlessness of a NPsMagn treatment at remediation concentrations (1 %) (Komárek *et al.* 2013) in Pb-polluted soils, which is in agreement with recent research in our laboratory concerning NPsMagn impact on sunflower plants under Cu pollution (Demangeat *et al.* 2021). Although, it is possible that the action of NPsMagn has been affected by different factors such as the application concentration, the plant species, duration of the experiment, the culture medium, or the plant development stage (Amde *et al.* 2017). It can also be nuanced that the size of the experimental set-up used may have been a limiting factor in plant development, as sunflowers can reach much greater heights and biomass in environment. In the present study, even if the 1 % NPsMagn did not impact the growth, the initiation of flower buds could be affected because buds were present in all the plants exposed to NPsMagn-Pb and they were more developed than in the others treatments after 90 days of growth. Indeed, no flower buds were observed for control treatment, and only one and two flower buds out of six plants respectively in μ Magn-Pb and Pb. In contrast with these results, previous work (Demangeat *et al.* 2021) showed a delay in flowering of sunflowers treated with NPsMagn and no flowering at all for sunflowers germinated and grown with NPsMagn under Cu pollution. However, in this study (Demangeat *et al.* 2021) the seeds were put to germinate directly in contact with the various treatments which could have caused a global growth delay in the case of NPsMagn treatments.

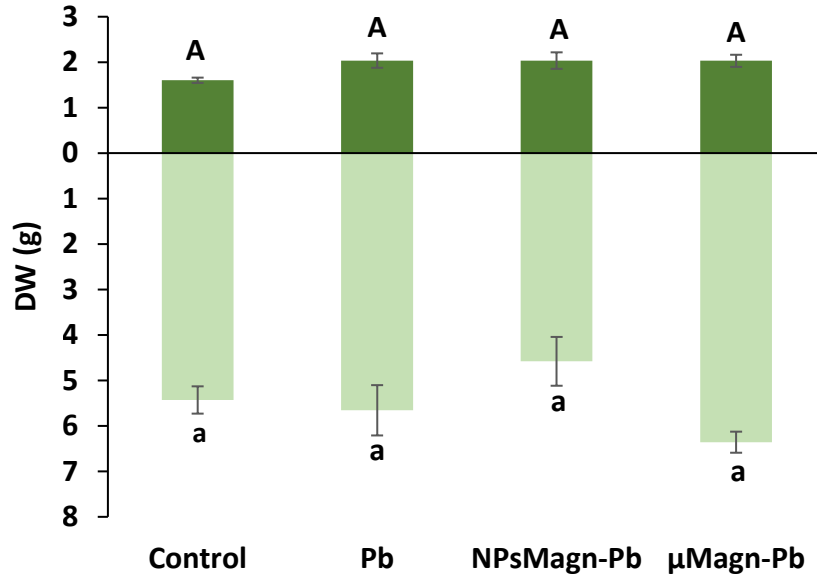


Figure 1 Dry weight (g) of leaves (dark green) and stems (light green) of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb. Data represent the mean \pm SEM (n= 6). Different letters indicate significant differences between treatments for each plant organ ($p < 0.05$).

Furthermore, here the presence of Pb in the soil at a final added concentration of 375 mg kg^{-1} soil did not impact leaves or stem biomass production, which is in contrast to what can be found in literature (Rengel 1997; Chauhan *et al.* 2020). However, Madejon *et al.* (2003) showed a different impact of TEs, including Pb, on the growth of sunflower according to the stage of development of the plant. Soil pollution significantly retarded early growth of youngest plant (1 month after sowing), especially root growth. In our experimental set-up, even if only an estimate of root biomass was made because the whole roots could not be precisely and equally recovered from the soil (ESI Figure S3), visual observation provided a sufficient bases to note that root growth was impacted by Pb pollution. On the contrary, Madejon *et al.* (2003) found no differences in sunflower biomass production after 130 days of growth in Pb contaminated soil (113 mg kg^{-1}) compared to control. As we introduced 18-day-old seedlings into the experimental set-up, it is likely that aerial parts were not impacted by Pb because they had already passed this critical growth period.

3.1.2. Pigment contents

For each condition, contents of chlorophylls (*Ca* and *Cb*) and carotenoids (*K*) follow the same pattern (**Figure 2**). As for plant growth parameters, the leaves of plants exposed to Pb contain similar pigment levels than control. The highest content is found after μ Magn-Pb treatment, under which the pigment contents are roughly one third higher than in the control. Reversely, the pigment contents are significantly lower in NPsMagn-Pb than in Pb and μ Magn-Pb treatments (**Figure 2**), and *Ca/Cb* ratio decreased by 11% in NPsMagn-Pb compared to control leaves (**Figure 2**). However, in spite of these differences in pigment contents, none of the treatments affected the maximum quantum yield of photosynthesis (ESI Table S2).

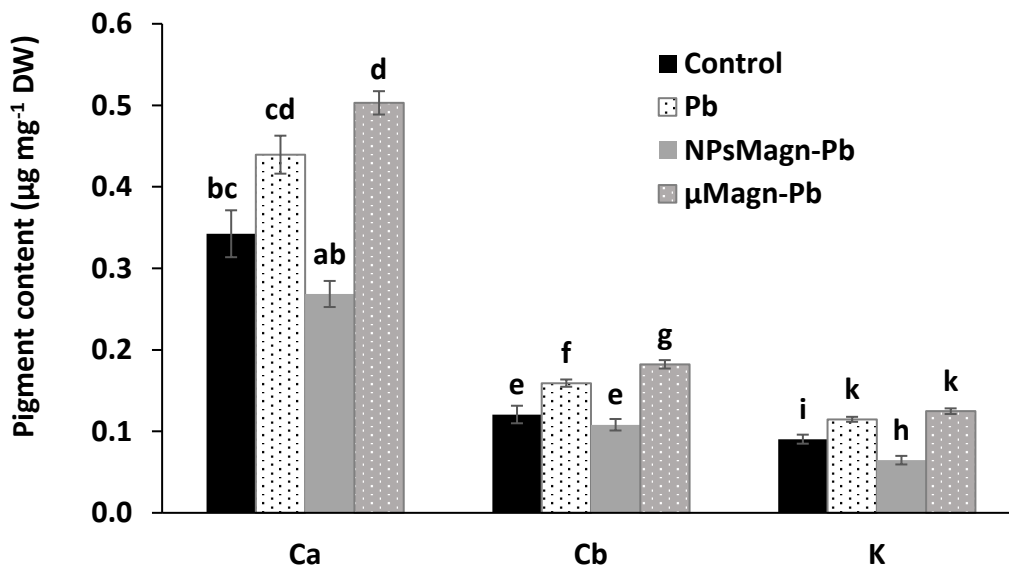


Figure 2 Pigment content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ DW) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb. Data represent the mean \pm SEM ($n=6$) of the pigment content measured in the leaves of sunflowers grown for 90 days in the different studied soils. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

Several studies reported that IONPs can affect pigment concentrations of exposed plants (Tripathi *et al.* 2017). Thus, to mention only sunflower, a previous work found that NPsMagn diminished chlorophyll and carotenoid contents up to 50 % in sunflower seedlings and the combination with Pb could contribute to increase this impact (Ursache-Oprisan *et al.* 2011).

Otherwise, IONPs can induce no effect (Wang, Wang, *et al.* 2019) or increase (Ghafariyan *et al.* 2013) pigment contents.

It has also been documented that photosynthesis inhibition is a symptom of Pb toxicity due to several Pb effects varying according to plant species: inhibition of chlorophyll and carotenoid synthesis, distorted chloroplast ultrastructure, obstruction of the electron transport system, inhibition of Calvin cycle enzymatic catalysis, impaired uptake of essential elements such as Mn and Fe and substitution of divalent cations by Pb, or increased chlorophyllase activity (Pourrut *et al.* 2011). Nevertheless, this impact is affected by Pb doses in combination with soil properties as will be discussed later (section 3.2.2).

3.1.3. Concentrations of total free amino acids

The amount of total free amino acids is equivalent among treatments ($6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW), except for NPsMagn-Pb which total free amino acids is higher by 50 % (**Figure 3**). As Pb alone seems to have no impact on sunflowers amino acid content (**Figure 3**), it is likely that NPsMagn have an effect on primary metabolites production. Zahra *et al.* (2017) have reported that the external addition of NPs can change the level of most amino acids in plants. They observed that the use of TiO_2 NPs in wheat induced an increase in amino acid production. The cessation of sugar biosynthesis, due to the disruption of photosynthesis, shifted the cellular metabolism to the use of amino acids as an alternative energy source (Silva *et al.* 2020). Also, Fe_2O_3 NPs induced an increase in cysteine and tyrosine content in wheat (Wang, Jiang, *et al.* 2019).

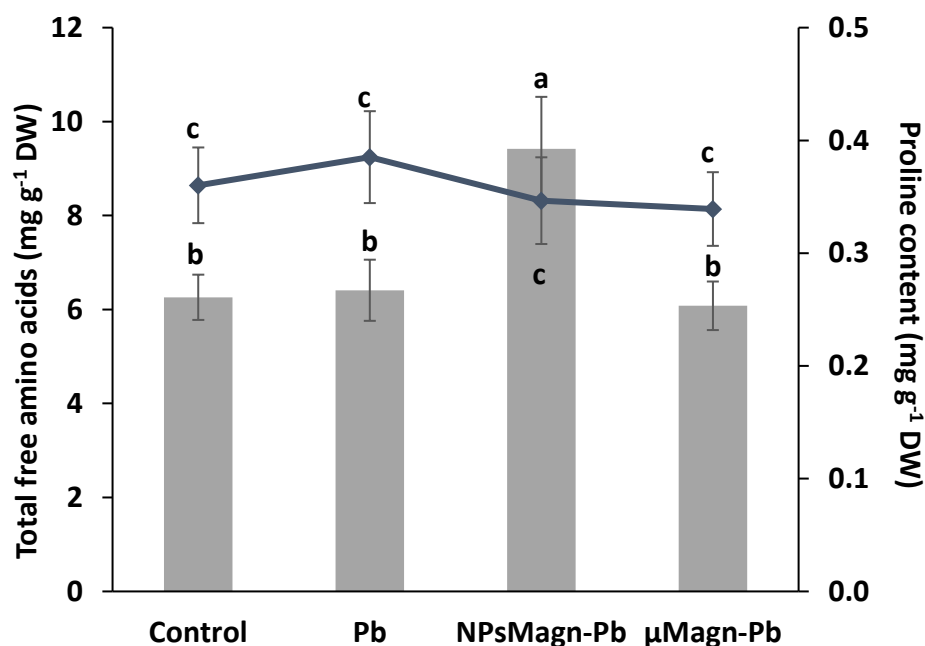


Figure 3 Total free amino acids ($\text{mg}_{\text{eq leucine}} \text{g}^{-1} \text{DW}$) (histogram) and proline content ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) (curve) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or $\mu\text{Magn-Pb}$. Data represent the mean \pm SEM ($n=6$). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.1.4. Oxidative stress response

TBARS (like malondialdehyde, MDA) are the result of the decomposition of unstable and reactive lipid peroxides produced by lipid peroxidation that occurs in cells after an oxidative stress (Hodges *et al.* 1999). As the TBARS content reflects the degree of oxidative injury to a plant cell, the decreased TBARS content is inferred to result from the absence of oxidative injury from the treatment applied. TBARS content in NPsMagn-Pb is similar to control, while this amount is significantly higher by 21 % in Pb and $\mu\text{Magn-Pb}$ treatment (**Figure 4A**). Thus, NPsMagn likely provide or induce a protection against lipid peroxidation caused by lead treatment, which was not observed for μMagn . Demangeat *et al.* (2021) showed a similar pattern of lipid peroxidation reduction in sunflower plants when they were exposed to NPsMagn or NPsMagn-Cu compared to Cu treatment. This protective effect of IONPs against lipid peroxidation has also been demonstrated for other plant species (Iannone *et al.* 2016; Palmqvist *et al.* 2017).

POD and SOD are part of the enzymes that participate in protection mechanisms against oxidative damage. We did not observe significant differences in POD or SOD activities between treatments, except for POD activity in Pb treated plants which is twice higher than in the control group (**Figure 4B, 4C**). Increasing the activities of SOD and POD has been shown to provide better mechanisms for protecting plants from oxidative damage (Abedi & Pakniyat 2010). In particular, POD, by catalyzing the reaction between H_2O_2 and ROOH to H_2O and R-OH, directly protects against cellular damage (Patykowski & Kołodziejek 2016). In their study, Demangeat *et al.* (2021) showed a correlation between TBARS content decreased and antioxidant POD activity increased in NPsMagn-Cu treated plants, suggesting that POD antioxidant response acted effectively against ROS under Cu exposition. In our study, the lower POD and TBARS contents seem to indicate less oxidative stress in the plants under the NPsMagn-Pb treatment, underlining the protective effect of NPsMagn. Interestingly, as already mentioned, amino acid content is higher in NPsMagn-Pb treated plants (**Figure 4**). It has been shown that under stress conditions, abundant amino acids are synthesized to help plant to cope with stress provoked imbalances (Hildebrandt 2018). On the other hand, the two-fold increase in POD and TBARS content in the Pb treatment suggests that plant cells probably accumulate more ROS in response to Pb pollution, which causes lipid peroxidation of membranes and induces antioxidant mechanisms to cope with.

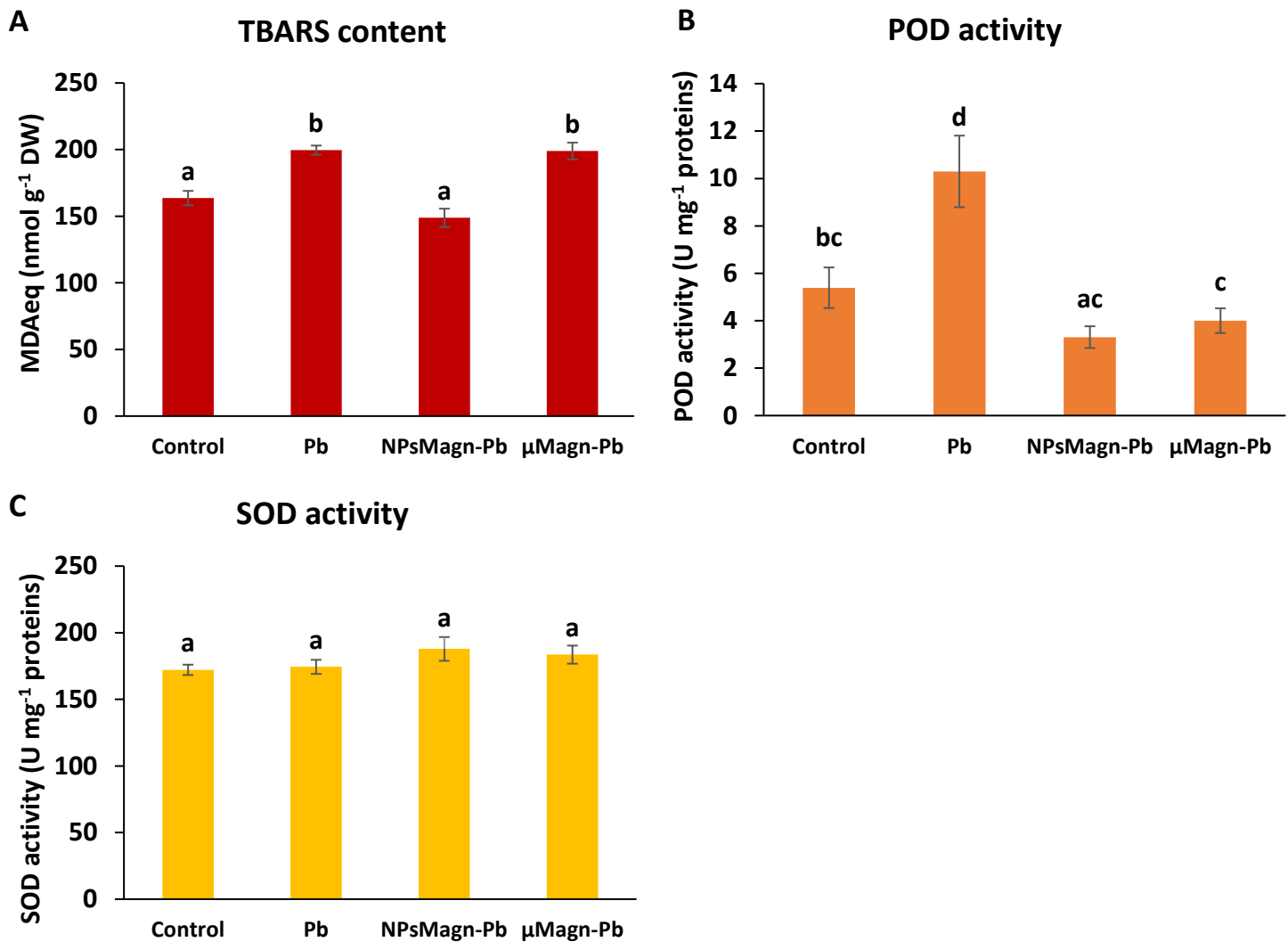


Figure 4 Lipid peroxidation and antioxidant activities measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μMagn-Pb. (A) TBARS content (nmol MDAeq per g DW); (B) POD activity (U mg⁻¹ protein); (C) SOD activity (U mg⁻¹ protein). Data represent the mean ± SEM (n=6). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2. Fate of NPsMagn and Pb in a water-soil-plant system

3.2.1. Uptake and translocation of NPsMagn from soil to plant

Iron was mainly found in the leaves where iron levels varied from 34 mg kg⁻¹ DW (Control) to 38 mg kg⁻¹ DW (NPsMagn-Pb) but no significant differences in Fe content in sunflower leaves were observed between treatments (**Figure 5A**). Even if Fe content in the stems is, regardless of the treatment, lower than in the leaves, it is significantly higher by 23 % in stems of plants

treated with NPsMagn-Pb compared to Control (**Figure 5A**). On the contrary, stem Fe content significantly decreased by 18 % in μ Magn-Pb condition compared to control.

Concerning the fate of NPsMagn in soil, no significant differences between treatments are found in magnetic susceptibility measurements in soil, suggesting that NPsMagn did not migrate over times with leachates (**Table 1**). NPsMagn tend to aggregate to mm-sized particles and such tendency to aggregate may result in decreased NPsMagn mobility in soil (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2019), as does the bonding of NPsMagn to clays and organic matter (OM) in the soil because of their high affinity for each other (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2019).

Table 1 Magnetite nanoparticles concentration (mg kg^{-1}) in sunflower roots and aerial parts, and in the soil samples, calculated from magnetic susceptibility measurements. Soil samples and sunflower plants were harvested after 90 days of exposure to NPsMagn-Pb. The quantification limit (QL) was determined at 40 mg kg^{-1} . Data represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters above indicate significant differences among plant or soil parts ($p < 0.05$).

		NPsMagn-Pb
Leaves	L1	<QL
	L2	<QL
	L3	<QL
Stem	T1	<QL
	T2	<QL
	T3	<QL
Roots	R1	3319 ± 493^a
	R2	1895 ± 435^b
	R3	1074 ± 164^b
Soil	S1	8171 ± 267^a
	S2	8587 ± 296^a
	S3	8202 ± 383^a

Previous studies in the literature have reported that NPs accumulated primarily at the root level, before entering the upper parts of the plant (Ma *et al.* 2010). Here, based on magnetic susceptibility measurements, NPsMagn were detected in the roots but not in aerial parts of sunflower plants grown in NPsMagn-Pb contaminated soil. NPsMagn content in roots significantly decreases from top to bottom of the roots (**Table 1**). Taking into account that the

concentration of NPsMagn in the soil does not change with depth, the possibility of absorption inside the roots and displacement with water flow, and not just adsorption onto sunflower roots as observed by Demangeat *et al.* (2021) must be considered to explain the root distribution of NPsMagn (**Table 1**). Adsorption of NPsMagn onto roots is due to positive surface charges of NPsMagn which are more likely to adsorb and accumulate on root surfaces negatively charged (Lv *et al.* 2019). On the other hand, depending on their size, NPs can penetrate the roots through the pores of the cell wall and then follow the apoplastic pathway to reach the vascular tissue. From the central cylinder (including the xylem and phloem), NPs can reach the aerial parts of plants by following the transpiration flow (Pérez-de-Luque 2017). Based on the data in **Figure 5** and **Table 1**, we cannot conclude on the presence of NPsMagn in the aerial tissues of sunflowers. However significant increase of Fe in whole aerial part and in stems of plants grown into NPsMagn-Pb media evidenced the possible occurrence of a small amount of NPsMagn in sunflower stems. The translocation of NPsMagn in plants varies among studies. It can either be found in barley aerial parts and roots without cellular penetration (Tombuloglu *et al.* 2019) or be detected in pumpkin leaves and roots, in stems close to the roots as well as in the root surface (Zhu *et al.* 2008). On the contrary they were not translocated in ryegrass (Wang *et al.* 2011).

As observed in **Figure 5B**, the cumulative amount of Fe released in NPsMagn-Pb soil solution was eight time higher than in the soil solutions of the control soil. However, it is worth mentioning that the amount of Fe leached after 75 days only represented 0.04 % of Fe present in soil. These results corroborate those observed by Demangeat *et al.* (2021) emphasizing that leaching had little effect on the mobility of NPsMagn in soil. An important increase on iron release in leachates took place from day 45 of the experiment in NPsMagn-Pb treatment. No pH or redox potential changes explaining this behavior before and after this release and the redox potential values are similar to other treatments. These patterns are not observed in leachates from treatments without plants, suggesting that plants play a role on iron release into the media. In fact, roots exudates (e.g. organic acids, sugars, amino acids, and proteins) or microbial activity (e.g. iron-reducing bacteria) may foster the dissolution of NPsMagn and Fe release into more bioavailable forms (such as those induced by the action of (phyto)siderophores)(Bastani *et al.* 2018). In the context of IONPs environmental fate and

ecotoxicity, our results highlights the low dispersion of NPsMagn into soil and the importance of the presence of a vegetation cover.

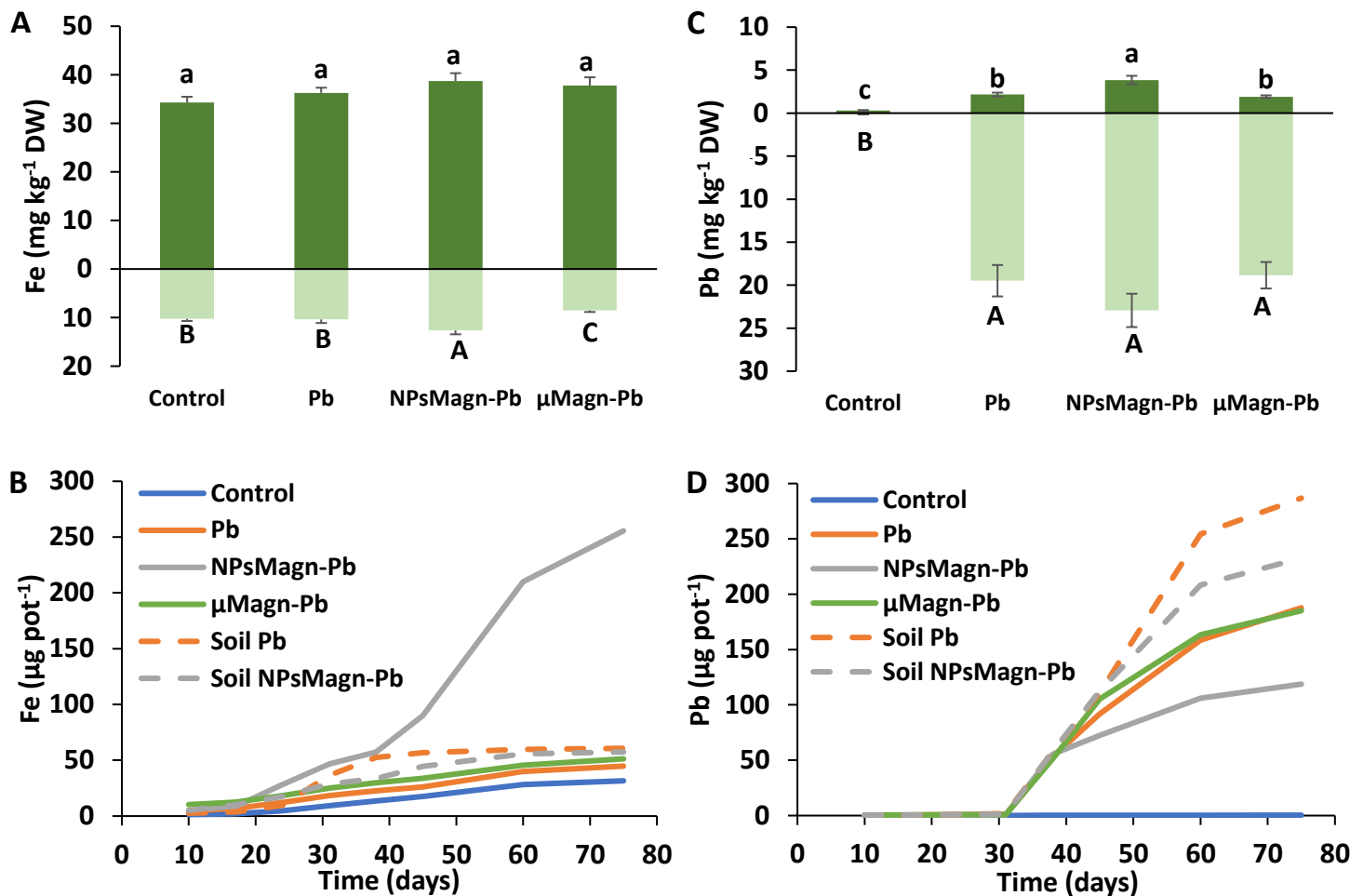


Figure 5 Iron (A) and lead (C) concentrations (mg kg^{-1} DW) in leaves (dark green) and stems (light green) measured by ICP-MS after 90 days of growth in the different studied soils. Data represent the mean \pm SEM ($n=6$). Different letters above or below the bars indicate significant differences between treatments for each plant organ ($p < 0.05$). Cumulative amounts of iron (B) and lead (D) leached ($\mu\text{g pot}^{-1}$) over the experimentation (day 10 to day 75) measured by ICP-MS. Dotted lines represent treatments without plant. Data represent the mean ($n=2$).

3.2.2. Chemical exchanges between plants, soil and soil solution

With the input of Pb in the soils, the amount of Pb was increased in plant stems and leaves (**Figure 5C**) and in the leaching solutions (**Figure 5D**). In all the aerial parts of the sunflowers, the Pb content tends to be higher when plants were grown in soil treated with NPsMagn-Pb

than in those treated with Pb or μ Magn-Pb (**Figure 5C**). The Pb content in leaves increased significantly by 78 % and 102 % in sunflowers treated with NPsMagn compared to plants in the Pb and μ Magn-Pb treatments, respectively. Furthermore, the Pb content in the stems is 6 to 9 times higher than in the leaves, with a maximum for the treatment with NPsMagn (22.93 mg kg⁻¹). Similar results have been observed in rice where Pb accumulate three times more in stems (Ashraf *et al.* 2020). Results indicated that addition of NPsMagn, in appropriate amount to achieve an optimal removal of TEs, could effectively increase the accumulation capacity of Pb for the studied plant. Previous findings noticed an increased Pb accumulation capacity of *Kochia scoparia* in nano zero valent iron amended soil up to a specific concentration of nanomaterials, then beyond this, Fe nanoparticle effect on Pb accumulation decreased (Daryabeigi Zand & Mikaeili Tabrizi 2020). They have found adverse effects of high concentrations of nano zero valent iron in soil on total Pb accumulation capacity of *K. scoparia*. In contrast, in another study, reduced accumulation of Pb in plant-soil system treated with compost added with maghemite nanoparticles was found (Martínez-Fernández *et al.* 2015).

Remarkably, the leaching of Pb was decreased respectively by 37 % and 20 % in Pb-contaminated soil enriched with NPsMagn relative to soil without NPsMagn, both with and without sunflower plants (**Figure 5D**). Within the same treatment, the presence of plants considerably affects the amount of Pb leached into the soil solution. Thus, lead content also decreases by 35 % and 50 % respectively in the presence of plants in the Pb and NPsMagn-Pb treatments compared to similar set-up without plants. Cover crop allowed to prevent TEs dispersion by water and wind erosion, as well as to reduce their mobility and bioavailability (Bolan *et al.* 2011). Phytostabilisation can happen depending of diverse processes (e.g. sorption, precipitation, complexation or valence reduction) (Ghosh & Singh 2005) and is controlled by various components (such as, pH and redox potential, OM content, soil texture, soil structure or microorganisms) (Chaignon *et al.* 2002). TEs mainly accumulate at rhizosperic level and within roots tissues depending of several factors like roots exudates, microorganism's presence in the rhizosphere, the binding of TEs on the cell wall or with metal binding molecules or their accrual into vacuoles (Shackira & Puthur 2019).

In addition, IONPs have a high affinity for Pb depending on environmental conditions (Liu *et al.* 2008). Thus, IONPs retain Pb in the soil and limit its dispersion in the soil solution as expected. In the treatments without plants, the soil pH is higher (pH 5.74 for cultivated soil

and pH 6.45 for non-cultivated soil) which leads to a higher release of colloids to which Pb is bound (Pédrot *et al.* 2009). Indeed, the impact of plants on leachate components can also be seen in **Figure 6** where the amount of dissolved organic carbon (DOC) is significantly higher by 92 % (Soil Pb) and 106 % (Soil NPsMagn-Pb) in leachates from set up without plants compared to their homologues with plants. Interestingly enough, even if the Pb proportion within leachates represent less than 0.2 % of total amount in soil, Pb concentration in leachates (e.g. 503 and 342 $\mu\text{g L}^{-1}$ in cumulated leachates from respectively Pb and NPsMagn-Pb treatments, data not shown) and Pb retention by NPsMagn is relevant considering lead exposure through water sources (Jarvis & Fawell 2021).

Moreover, it is worth to be noted that Pb adsorption by NPsMagn did not limit Pb uptake by the plant (**Figure 5C**). At the rhizospheric level, Pb penetrates into roots via apoplastic pathway or through Ca^{2+} permeable channels (Pourrut *et al.* 2011). We can also hypothesize that binding of NPsMagn to the roots of sunflowers enhanced Pb uptake by plants by making rhizospheric Pb more bioavailable. Concerning roots exudates, Luo *et al.* (2017). showed that amino acids like alanine and proline could influence Pb uptake by *Sedum alfredii*. Finally, even no growth improvement has been shown, plants treated with NPsMagn-Pb are doing as well as control or Pb-treated plants but with higher amounts of Pb in their aerial parts.

Furthermore, as discussed above, the amount of DOC is significantly higher in leachates from set up without plants compared to their homologues with plants. While in the presence of plants the NPsMagn-Pb treatment does not impact the DOC amount in leachates, DOC in leachates increased by 115 % and 167 % respectively for Pb and $\mu\text{Magn-Pb}$ compared to control. To date, few studies have been conducted on the influence of OM on the surface reactions of IONPs. OM and IONPs interact mainly through adsorption of OM onto particle surfaces, and this adsorption has a significant impact on the adsorption of other ions and molecules (Vindedahl *et al.* 2016). Our results highlight that Pb seems to increase OM leaching and inversely, NPsMagn addition allowed to decrease OM loss in leachates. In addition, as discussed above for Pb leaching, the presence of plant within the experimental set-up seems to prevent OM leaching. Poirier *et al.* reviewed the link between roots characteristics and soil OM stabilization processes (Poirier *et al.* 2018). They identified several roots traits which participate to retain OM into soil: (i) accumulation in the rhizosphere of root molecules

recalcitrant against decomposition (e.g. root suberin (Andreetta *et al.* 2013)), (ii) occlusion in soil aggregates, which limits access to microorganisms and enzymes, and (iii) interaction with soils minerals and metals (formation of stable organo-mineral associations) (Watteau *et al.* 2006). Also, high roots length and density (Bodner *et al.* 2014) are key factors for OM stabilization as it allows to entangle and aggregate of soil particles (Angers & Caron 1998) and stimulate microbial activity by producing exudates that act as binding agent (Gould *et al.* 2016).

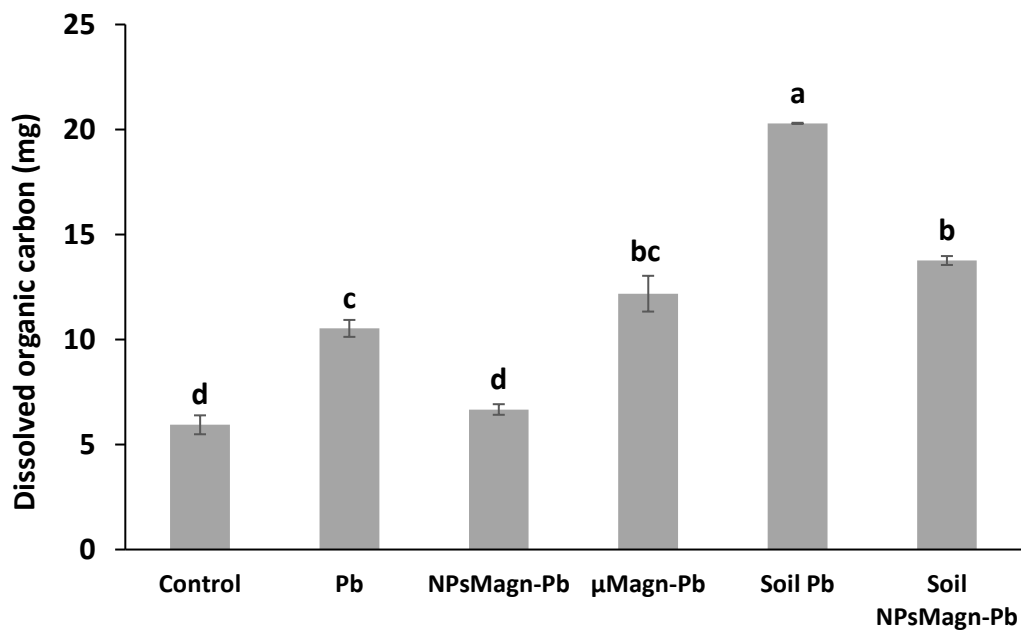


Figure 6 Total amount of dissolved organic carbon leached over the experiment (mg). Leachates were filtrated at 0.2μm with syringe filters to dissociate the particulate from the dissolved phase. Data represent the mean ± SEM (n=6). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.3. Water stress response during interaction with NPsMagn-Pb

Research on NPs is growing, but few studies have investigated the relationships between NPs and rhizosphere as well as plant-water relations. However, the response of plants to water stress is a crucial element in their interactions with TEs. Recent studies on the application of NPs under water stress in plants show promising results (Kandhol *et al.* 2022). Thus, we sought to evaluate the impact of NPsMagn on water relations in our cropping system in response to water stress through different measurements. At each water stress period, all plants showed

visual symptoms of water deficit but it was significantly less pronounced in sunflowers treated with NPsMagn. Different measurements have been performed to further investigate this observation. First, we determined soil water potential, which corresponds to a pressure measurement quantifying the energy level of the water molecules in a solution. The water potential of the NPsMagn treated soil was four times higher after a 3-days water stress than the water potential of control soil (**Figure 7A**). It is likely that the addition of a nanoparticulate fraction (1 %) has modified the soil structure, as clay minerals do due to their high surface area, increasing the water reserve of the soil. Ajayi and Horn (2016) tested the addition of 2, 5 and 10 % of clay (bentonite) in fine sand which lead to an increase of water holding capacity. It can be explained by the increasing internal surface area of the amended soil (Hartmann *et al.* 2009), availability of binding site, and mineralogy of the clay material (Ajayi & Horn 2016; Ajayi *et al.* 2016). Thus, water can either be stored into soil macropores, attracted to the outer surfaces of clay minerals, or retained as intercalated water in spaces between clay layers.

In addition, we can expect that IONPs, that can bind to OM, could potentially promote soil water retention up to a certain threshold over a long-term effect. Results in **Figure 6** (section 3.2.2) confirm that DOC is more retained in soil in presence of NPsMagn. Those results support the hypothesis that NPsMagn could improve water retention in soil (Lal 2020).

In the search for easily measurable indicators of water stress, we made analyses of the effects of water stress periods on leaf angle. The evolution of the leaf angle according to field capacity (FC) or water deficiency (WD) periods shows that the plants of each treatment follow the same pattern except for those exposed to NPsMagn (**Figure 7B**). Thus, leaf angle of control plants varies with increasing plant age in range of $106^{\circ} \pm 2$ to $90^{\circ} \pm 4$ during FC periods; and from $28^{\circ} \pm 2$ to $74^{\circ} \pm 5$ during the WD periods; that is to say a decrease in the angle from 73 % to 25 % for water stress periods starting at days 56th and 84th of plant culture, respectively. On the contrary, leaves angles of plants exposed to NPsMagn varies from $111^{\circ} \pm 5$ to $105^{\circ} \pm 2$ in FC and in range of $56^{\circ} \pm 3$ to $107^{\circ} \pm 2$ in WD, so that a significant reduction in leaf angles from only 49 % to 2 % for water stress periods starting at days 56th and 84th of plant culture, respectively. In addition, we have also evaluated the leaf relative water content (RWC) under water stress periods. As RWC reflects the balance between water supply to the leaf and transpiration rate, this is thus an important indicator of water status in plants (Soltys-Kalina *et al.* 2016).

Interestingly, we determined that only in the presence of NPsMagn the leaf RWC is significantly higher compared to control (**Figure 7A**).

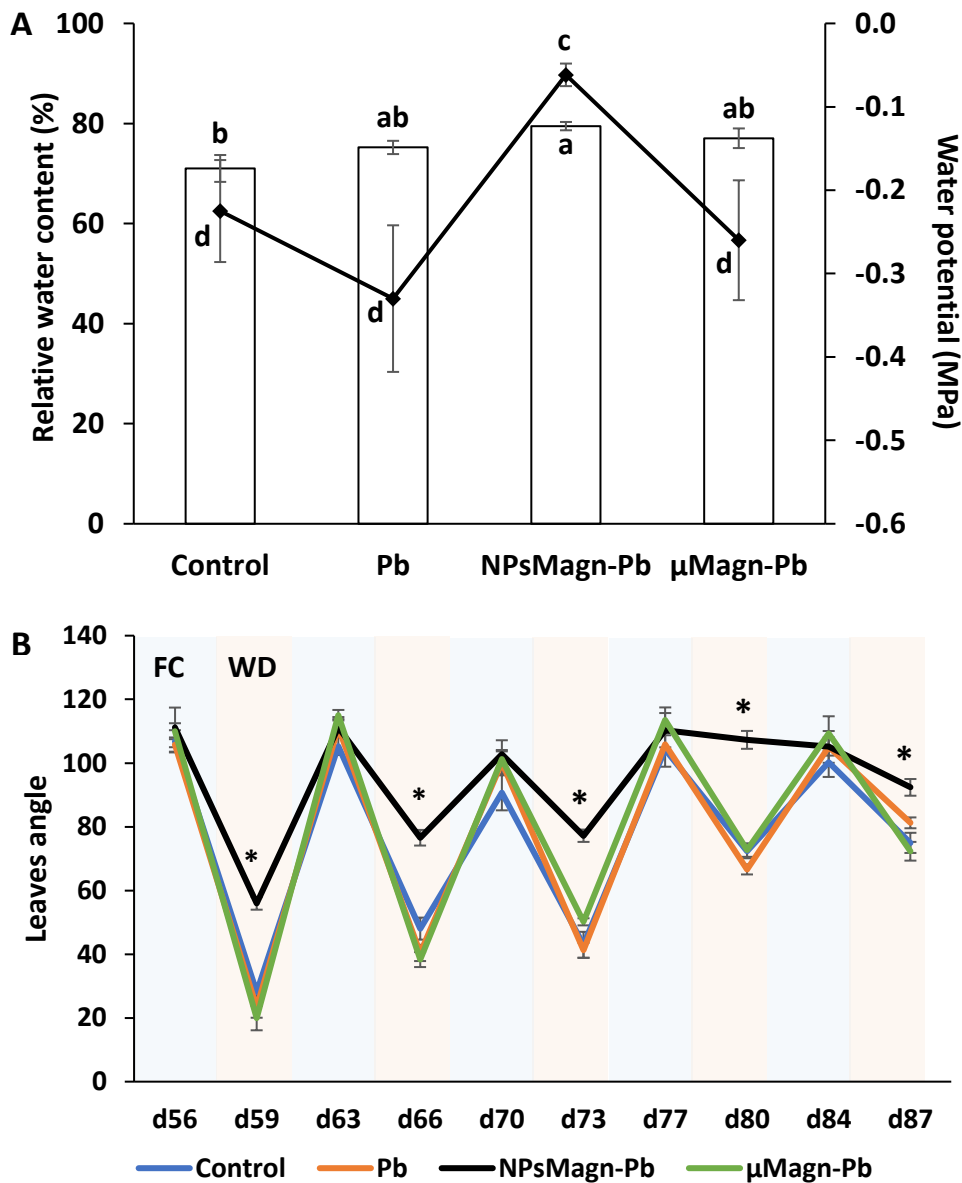


Figure 7 Stress water response measured during and after 90 days of growth on control soil or containing Pb, NPsMagn-Pb or μMagn-Pb. (A) Water potential (histogram) of the different studied soils measured by WP4C dew meter point after plants harvest and relative water content (%) (curve) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth. (B) Leaves angle measured at different times of culture (FC = field capacity, pale blue; WD = water deficiency, pale pink). Measures correspond to the angle between the abaxial face of the leaf and the petiole. Data represent the mean \pm SEM (n=6 or 12 for leaves angle). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$). An asterisk indicates significant difference with control ($p < 0.05$).

Finally, in case of water stress, the determination of proline content is used as an indicator of stress in plants (Verbruggen & Hermans 2008). Here, no difference in proline content could be noted (**Figure 3**). In their study on nano-maghemite, Martínez-Fernández *et al.* (2015) did not find any difference between treatment in RWC, leaves surface area or proline content in sunflower under water stress. As in their study, we did not observe production of proline as a stress response marker, but rather with leaves angles and RWC and measurements on soil water potential. Even if some NPs have been shown to have a deleterious impact at the root level by mechanically disrupting cell membranes and walls, thus affecting water absorption by the roots (Klaine *et al.* 2008), in other cases NPs improve tolerance to water stress by affecting different physiological and biochemical mechanisms such as improvement of photosynthetic parameters, regulation of stomatal conductance, antioxidant activity, nutrient and water use efficiency or osmolyte content (Kandhol *et al.* 2022). For instance, the application of different metal oxide NPs into soybean improved biomass reduction rate, RWC and drought tolerance index (Linh *et al.* 2020), and IONPs treatment allowed to enhance biomass, photosynthesis efficiency, nutrient uptake and antioxidant enzymes content in *Oryza sativa* (Ahmed *et al.* 2021).

Overall, our results show that NPsMagn seem to have a considerable impact on soil structure and water retention, which indirectly influences plant physiology. Further studies would be needed to describe these structural changes more precisely. In addition, gene expression analysis in plants treated with NPs under water stress conditions is a new avenue to explore because different studies show that application of NPs under water stress induces an increase in the expression of drought-responsive genes (Du *et al.* 2018; Linh *et al.* 2020). Thus, the improvement of drought tolerance could be mediated by triggering the expression of drought-related genes via NPs.

4. Conclusions

To conclude, even at high concentrations as those recommended for remediation, NPsMagn have little impact on the growth and on some physiological and biochemical responses of sunflower, and instead showed a protective effect against oxidative impact. Moreover, NPsMagn seem to enhance i) Pb availability and accumulation in plants, as higher amount of

Pb has been measured in sunflower aerial parts, and ii) Pb stabilization within the soil, as smaller amount of Pb has been determined in soil leachates. Likewise, Fe content was superior in plants treated with NPsMagn, and NPsMagn decreased the loss of soil dissolved organic matter and Pb transfer in leachates. Finally, here we show that plants treated with NPsMagn presented an improved water stress response and leaf water status, which could be in part explained by the enhanced retention of water in soils containing NPsMagn. All those results indicated that NPsMagn are promising materials for TEs remediation purposes, and are thus promising avenues of research, particularly for the agricultural sector, where water stress is one of the main causes of losses. However, further research is needed to understand the underlying mechanisms, especially at the molecular level. These data provide new answers where the knowledge about the environmental fate and toxicity of nanoparticles is still inadequate.

Author contributions

LM: conceptualization, methodology, validation, resources, formal analysis, investigation, data curation, writing – original draft, visualization. MBLC: methodology, validation, investigation. MP: conceptualization, methodology, validation, writing –review & editing, supervision, funding acquisition. FCH: conceptualization, methodology, validation, writing – review & editing, supervision, funding acquisition, project administration.

Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the SURFNANO project funded by the CNRS-INSU EC2CO program and the SynFeSol project funded by the Brittany Region (AAP TRANSFERT 2019). Through the support of the GeOHeLiS analytical platform of Rennes University, this publication is also supported by the European Union through the European Regional Development Fund (FEDER), the French Region of Brittany and Rennes Metropole. We also thank THEMIS platform and Laura Fablet for their contribution to the TEM images acquisition as well as Pierrick Roperch

for magnetic susceptibility analyses. Léa Mounier was supported by a doctoral research grant from the University of Rennes 1–French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Abedi T., Pakniyat H. (2010) Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **46**:27–34.
- Ahmed T., Noman M., Manzoor N., Shahid M., Abdullah M., Ali L., Wang G., Hashem A., Al-Arjani A.-B.F., Alqarawi A.A., Abd_Allah E.F., Li B. (2021) Nanoparticle-based amelioration of drought stress and cadmium toxicity in rice via triggering the stress responsive genetic mechanisms and nutrient acquisition. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **209**:111829.
- Ajayi A.E., Holthusen D., Horn R. (2016) Changes in microstructural behaviour and hydraulic functions of biochar amended soils. *Soil and Tillage Research* **155**:166–175.
- Ajayi A.E., Horn R. (2016) Comparing the potentials of clay and biochar in improving water retention and mechanical resilience of sandy soil. *International Agrophysics* **30**:391–399.
- Alidokht L., Khataee A.R., Reyhanitabar A., Oustan S. (2011) Reductive removal of Cr(VI) by starch-stabilized Fe₀ nanoparticles in aqueous solution. *Desalination* **270**:105–110.
- Al-Sid-Cheikh M., Pédrot M., Dia A., Davranche M., Jeanneau L., Petitjean P., Bouhnik-Le Coz M., Cormier M.-A., Grasset F. (2019) Trace element and organic matter mobility impacted by Fe₃O₄ nanoparticle surface coating within wetland soil. *Environmental Science: Nano* **6**:3049–3059.
- Amde M., Liu J., Tan Z.-Q., Bekana D. (2017) Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution* **230**:250–267.
- Andreetta A., Dignac M.-F., Carnicelli S. (2013) Biological and physico-chemical processes influence cutin and suberin biomarker distribution in two Mediterranean forest soil profiles. *Biogeochemistry* **112**:41–58.
- Angers D.A., Caron J. (1998) Plant-induced Changes in Soil Structure: Processes and Feedbacks. *Biogeochemistry* **42**:55–72.
- Ashraf U., Mahmood M.H.-R., Hussain S., Abbas F., Anjum S.A., Tang X. (2020) Lead (Pb) distribution and accumulation in different plant parts and its associations with grain Pb contents in fragrant rice. *Chemosphere* **248**:126003.
- Auffan M., Rose J., Proux O., Borschneck D., Masion A., Chaurand P., Hazemann J.-L., Chaneac C., Jolivet J.-P., Wiesner M.R., Van Geen A., Bottero J.-Y. (2008) Enhanced Adsorption of Arsenic onto Maghemite Nanoparticles: As(III) as a Probe of the Surface Structure and Heterogeneity. *Langmuir* **24**:3215–3222.

- Bastani S., Hajiboland R., Khatamian M., Saket-Oskoui M. (2018) Nano iron (Fe) complex is an effective source of Fe for tobacco plants grown under low Fe supply. *Journal of soil science and plant nutrition* **18**:524–541.
- Bodner G., Leitner D., Kaul H.-P. (2014) Coarse and fine root plants affect pore size distributions differently. *Plant and Soil* **380**:133–151.
- Bolan N.S., Park J.H., Robinson B., Naidu R., Huh K.Y. (2011) Phytostabilization. *Advances in Agronomy*. Elsevier (eds), pp 145–204.
- Boparai H.K., Joseph M., O'Carroll D.M. (2011) Kinetics and thermodynamics of cadmium ion removal by adsorption onto nano zerovalent iron particles. *Journal of Hazardous Materials* **186**:458–465.
- Borch T., Kretzschmar R., Kappler A., Cappellen P.V., Ginder-Vogel M., Voegelin A., Campbell K. (2010) Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics. *Environmental Science & Technology* **44**:15–23.
- Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–254.
- Cakmak I., Marschner H. (1992) Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology* **98**:1222–1227.
- Chaignon V., Di Malta D., Hinsinger P. (2002) Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* **154**:121–130.
- Chauhan P., Mathur J. (2018) Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of multiple pollutants in the environment : a review. *Journal of Biological Sciences and Medicine* **4**:5–16.
- Chauhan P., Rajguru A.B., Dudhe M.Y., Mathur J. (2020) Efficacy of lead (Pb) phytoextraction of five varieties of *Helianthus annuus* L. from contaminated soil. *Environmental Technology & Innovation* **18**:100718.
- Chen J., Qiu X., Fang Z., Yang M., Pokeung T., Gu F., Cheng W., Lan B. (2012) Removal mechanism of antibiotic metronidazole from aquatic solutions by using nanoscale zero-valent iron particles. *Chemical Engineering Journal* **181–182**:113–119.
- Claudio C., Iorio E. di, Liu Q., Jiang Z., Barrón V. (2017) Iron Oxide Nanoparticles in Soils: Environmental and Agronomic Importance. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **17**:4449–4460.
- Daryabeigi Zand A., Mikaeili Tabrizi A. (2020) Effect of zero-valent iron nanoparticles on the phytoextraction ability of *Kochia scoparia* and its response in Pb contaminated soil. *Environmental Engineering Research* **26**:200227–0.

- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Davranche M., Cabello-Hurtado F. (2020) Surface modifications at the oxide/water interface: Implications for Cu binding, solution chemistry and chemical stability of iron oxide nanoparticles. *Environmental Pollution* **257**:113626.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-le-Coz M., Grasset F., Hanna K., Kamagate M., Cabello-Hurtado F. (2018) Colloidal and chemical stabilities of iron oxide nanoparticles in aqueous solutions: the interplay of structural, chemical and environmental drivers. *Environmental Science: Nano* **5**:992–1001.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Roperch P., Compaoré G., Cabello-Hurtado F. (2021) Investigating the remediation potential of iron oxide nanoparticles in Cu-polluted soil–plant systems: coupled geochemical, geophysical and biological approaches. *Nanoscale Advances* **3**:2017–2029.
- Dimkpa C.O., White J.C., Elmer W.H., Gardea-Torresdey J. (2017) Nanoparticle and Ionic Zn Promote Nutrient Loading of Sorghum Grain under Low NPK Fertilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:8552–8559.
- Du Y.-T., Zhao M.-J., Wang C.-T., Gao Y., Wang Y.-X., Liu Y.-W., Chen M., Chen J., Zhou Y.-B., Xu Z.-S., Ma Y.-Z. (2018) Identification and characterization of GmMYB118 responses to drought and salt stress. *BMC Plant Biology* **18**:320.
- Fahad, Balouch A., Agheem M.H., Memon S.A., Baloch A.R., Tunio A., Abdullah, Pato A.H., Jagirani M.S., Panah P., Gabole A.A., Qasim S. (2020) Efficient mitigation of cadmium and lead toxicity in coriander plant utilizing magnetite (Fe₃O₄) nanofertilizer as growth regulator and antimicrobial agent. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **102**:1–12.
- Ghafariyan M.H., Malakouti M.J., Dadpour M.R., Stroeve P., Mahmoudi M. (2013) Effects of Magnetite Nanoparticles on Soybean Chlorophyll. *Environmental Science & Technology*:10645–10652.
- Ghosh M., Singh S.P. (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* **3**:1–18.
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* **59**:309–314.
- Gould I.J., Quinton J.N., Weigelt A., De Deyn G.B., Bardgett R.D. (2016) Plant diversity and root traits benefit physical properties key to soil function in grasslands. *Ecology Letters* **19**:1140–1149.
- Groupement d'intérêt scientifique sur les sols (France) (2011) *L'état des sols de France: les services rendus par les sols, la diversité des sols de France, l'état des sols de France et son évolution*. GIS Sol, S.l.

- Hadi F., Bano A., Fuller M.P. (2010) The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (*Zea mays L.*): the role of plant growth regulators (GA3 and IAA) and EDTA alone and in combinations. *Chemosphere* **80**:457–462.
- Hartmann P., Fleige H., Horn R. (2009) Physical properties of forest soils along a fly-ash deposition gradient in Northeast Germany. *Geoderma* **150**:188–195.
- Hildebrandt T.M. (2018) Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. *Plant Molecular Biology* **98**:121–135.
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**:604–611.
- Iannone M.F., Groppa M.D., de Sousa M.E., Fernández van Raap M.B., Benavides M.P. (2016) Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum L.*) development: Evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* **131**:77–88.
- Islam E., Yang X., Li T., Liu D., Jin X., Meng F. (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* **147**:806–816.
- Jarvis P., Fawell J. (2021) Lead in drinking water – An ongoing public health concern? *Current Opinion in Environmental Science & Health* **20**:100239.
- Jiang Z., Lv L., Zhang W., Du Q., Pan B., Yang L., Zhang Q. (2011) Nitrate reduction using nanosized zero-valent iron supported by polystyrene resins: Role of surface functional groups. *Water Research* **45**:2191–2198.
- Journal Officiel République Française (1998) Arrêté du 3 juin 1998 modifiant l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. *Journal Officiel République Française*, 149: 9961-9962. [online] URL: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000206637/> (accessed 1 September 2021).
- Jungcharoen P., Pédrot M., Choueikani F., Pasturel M., Hanna K., Heberling F., Tesfa M., Marsac R. (2021) Probing the effects of redox conditions and dissolved Fe²⁺ on nanomagnetite stoichiometry by wet chemistry, XRD, XAS and XMCD. *Environmental Science: Nano* **8**:2098–2107.
- Kah M., Tufenkji N., White J.C. (2019) Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature Nanotechnology* **14**:532–540.
- Kandhol N., Jain M., Tripathi D.K. (2022) Nanoparticles as potential hallmarks of drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* **174**:e13665.

- Karam F., Lahoud R., Masaad R., Kabalan R., Breidi J., Chalita C., Rouphael Y. (2007) Evapotranspiration, seed yield and water use efficiency of drip irrigated sunflower under full and deficit irrigation conditions. *Agricultural Water Management* **90**:213–223.
- Keunen E., Remans T., Bohler S., Vangronsveld J., Cuypers A. (2011) Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* **12**:6894–6918.
- Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R. (2008) Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**:1825–1851.
- Komárek M., Vaněk A., Ettler V. (2013) Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – A review. *Environmental Pollution* **172**:9–22.
- Konate A., He X., Zhang Z., Ma Y., Zhang P., Alugongo G.M., Rui Y. (2017) Magnetic (Fe₃O₄) Nanoparticles Reduce Heavy Metals Uptake and Mitigate Their Toxicity in Wheat Seedling. *Sustainability* **9**:790.
- Kumar A., Kumar A., Cabral-Pinto M., Chaturvedi A.K., Shabnam A.A., Subrahmanyam G., Mondal R., Gupta D.K., Malyan S.K., Kumar S.S., A. Khan S., Yadav K.K. (2020) Lead Toxicity: Health Hazards, Influence on Food Chain, and Sustainable Remediation Approaches. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**:2179.
- Kumar A., Prasad M.N.V. (2018) Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **166**:401–418.
- Kushwaha A., Hans N., Kumar S., Rani R. (2018) A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **147**:1035–1045.
- Lal R. (2020) Soil organic matter and water retention. *Agronomy Journal* **112**:3265–3277.
- Latif A., Sheng D., Sun K., Si Y., Azeem M., Abbas A., Bilal M. (2020) Remediation of heavy metals polluted environment using Fe-based nanoparticles: Mechanisms, influencing factors, and environmental implications. *Environmental Pollution* **264**:114728.
- Liang L., Yang W., Guan X., Li J., Xu Z., Wu J., Huang Y., Zhang X. (2013) Kinetics and mechanisms of pH-dependent selenite removal by zero valent iron. *Water Research* **47**:5846–5855.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**:591–592.
- Linh T.M., Mai N.C., Hoe P.T., Lien L.Q., Ban N.K., Hien L.T.T., Chau N.H., Van N.T. (2020) Metal-Based Nanoparticles Enhance Drought Tolerance in Soybean. *Journal of Nanomaterials* **2020**:e4056563.

- Liu J.-F., Zhao Z.-S., Jiang G.-B. (2008) Coating Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles with Humic Acid for High Efficient Removal of Heavy Metals in Water. *Environmental Science & Technology* **42**:6949–6954.
- Luo Q., Wang S., Sun L., Wang H. (2017) Metabolic profiling of root exudates from two ecotypes of *Sedum alfredii* treated with Pb based on GC-MS. *Scientific Reports* **7**:39878.
- Lv J., Christie P., Zhang S. (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano* **6**:41–59.
- Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* **408**:3053–3061.
- Madejon P., Murillo J., Maranon T., Cabrera F., Soriano M. (2003) Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill. *The Science of The Total Environment* **307**:239–257.
- Magné C., Larher F. (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* **200**:115–118.
- Martínez-Fernández D., Vítková M., Bernal M.P., Komárek M. (2015) Effects of Nanomaghemite on Trace Element Accumulation and Drought Response of *Helianthus annuus* L. in a Contaminated Mine Soil. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**:101.
- Massart R. (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* **17**:1247–1248.
- Natasha N., Shahid M., Khalid S., Bibi I., Naeem M.A., Niazi N., Tack F., Ippolito J., Rinklebe J. (2021) Influence of biochar on trace element uptake, toxicity and detoxification in plants and associated health risks: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **16**:1–41.
- Palmqvist N.G.M., Seisenbaeva G.A., Svedlindh P., Kessler V.G. (2017) Maghemite Nanoparticles Acts as Nanozymes, Improving Growth and Abiotic Stress Tolerance in *Brassica napus*. *Nanoscale Research Letters* **12**:631.
- Patykowski J., Kołodziejek J. (2016) Changes in Antioxidant Enzyme Activities of European Mistletoe (*Viscum album* L. subsp. Album) Leaves as a Response to Environmental Stress Caused by Pollution of the Atmosphere by Nitrogen Dioxide. *Polish Journal of Environmental Studies* **25**:725–732.
- Pédrot M., Dia A., Davranche M. (2009) Double pH control on humic substance-borne trace elements distribution in soil waters as inferred from ultrafiltration. *Journal of Colloid and Interface Science* **339**:390–403.

- Pérez-de-Luque A. (2017) Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? *Frontiers in Environmental Science* **5**:12.
- Perl E.S. (2020) The limits of lead (Pb) phytoextraction and possibilities of phytostabilization in contaminated soil: a critical review. *International Journal of Phytoremediation* **22**:916–930.
- Poirier V., Roumet C., Munson A.D. (2018) The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biology and Biochemistry* **120**:246–259.
- Pourrut B., Shahid M., Dumat C., Winterton P., Pinelli E. (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. Whitacre DM (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer New York. New-York, pp 113–136.
- Rahman S.U., Wang X., Shahzad M., Bashir O., Li Y., Cheng H. (2022) A review of the influence of nanoparticles on the physiological and biochemical attributes of plants with a focus on the absorption and translocation of toxic trace elements. *Environmental Pollution* **310**:119916.
- Rengel Z. (1997) *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*. CRC Press.
- Rizwan M., Ali S., Rehman M.Z. ur, Riaz M., Adrees M., Hussain A., Zahir Z.A., Rinklebe J. (2021) Effects of nanoparticles on trace element uptake and toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **221**:112437.
- Rui M., Ma C., Hao Y., Guo J., Rui Y., Tang X., Zhao Q., Fan X., Zhang Z., Hou T., Zhu S. (2016) Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science* **7**:815.
- Senesil G.S., Baldassarre G., Senesi N., Radina B. (1999) Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* **39**:343–377.
- Shackira A.M., Puthur J.T. (2019) Phytostabilization of Heavy Metals: Understanding of Principles and Practices. Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P (eds) *Plant-Metal Interactions*. Springer International Publishing, Cham, pp 263–282.
- Silva S., Ribeiro T.P., Santos C., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. (2020) TiO₂ nanoparticles induced sugar impairments and metabolic pathway shift towards amino acid metabolism in wheat. *Journal of Hazardous Materials* **399**:122982.
- Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.K. (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**:405–412.
- Soltys-Kalina D., Plich J., Strzelczyk-Żyta D., Śliwka J., Marczewski W. (2016) The effect of drought stress on the leaf relative water content and tuber yield of a half-sib family of ‘Katahdin’-derived potato cultivars. *Breeding Science* **66**:328–331.

- Tang J., Myers M., Bosnick K.A., Brus L.E. (2003) Magnetite Fe₃O₄ Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry B* **107**:7501–7506.
- Tombuloglu H., Slimani Y., Tombuloglu G., Almessiere M., Baykal A. (2019) Uptake and translocation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and its impact on photosynthetic genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chemosphere* **226**:110–122.
- Tripathi D.K., Shweta, Singh S., Singh S., Pandey R., Singh V.P., Sharma N.C., Prasad S.M., Dubey N.K., Chauhan D.K. (2017) An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**:2–12.
- Troll, Lindsley J. (1955) A Photometric Method for the Determination of Proline. *Journal of Biological Chemistry* **215**:655–660.
- Ursache-Oprisan M., Focanici E., Creanga D., Caltun O. (2011) Sunflower chlorophyll levels after magnetic nanoparticle supply. *African Journal of Biotechnology* **36**:7092–7098.
- Verbruggen N., Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**:753–759.
- Vindedahl A.M., Strehlau J.H., Arnold W.A., Penn R.L. (2016) Organic matter and iron oxide nanoparticles: aggregation, interactions, and reactivity. *Environmental Science: Nano* **3**:494–505.
- Wang Y., Jiang F., Ma C., Rui Y., Tsang D.C.W., Xing B. (2019) Effect of metal oxide nanoparticles on amino acids in wheat grains (*Triticum aestivum*) in a life cycle study. *Journal of Environmental Management* **241**:319–327.
- Wang H., Kou X., Pei Z., Xiao J.Q., Shan X., Xing B. (2011) Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology* **5**:30–42.
- Wang Y., Wang S., Xu M., Xiao L., Dai Z., Li J. (2019) The impacts of γ-Fe₂O₃ and Fe₃O₄ nanoparticles on the physiology and fruit quality of muskmelon (*Cucumis melo*) plants. *Environmental Pollution* **249**:1011–1018.
- Watteau F., Villemin G., Burtin G., Jocteur-Monrozier L. (2006) Root impact on the stability and types of micro-aggregates in silty soil under maize. *European Journal of Soil Science* **57**:247–257.
- Zahra Z., Waseem N., Zahra R., Lee H., Badshah M.A., Mehmood A., Choi H.-K., Arshad M. (2017) Growth and Metabolic Responses of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivated in Phosphorus-Deficient Soil Amended with TiO₂ Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:5598–5606.

- Zhang X., Lin S., Chen Z., Megharaj M., Naidu R. (2011) Kaolinite-supported nanoscale zero-valent iron for removal of Pb^{2+} from aqueous solution: Reactivity, characterization and mechanism. *Water Research* **45**:3481–3488.
- Zhu H., Han J., Xiao J.Q., Jin Y. (2008) Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* **10**:685–784.
- Zhu H., Jia Y., Wu X., Wang H. (2009) Removal of arsenic from water by supported nano zero-valent iron on activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* **172**:1591–1596.

CHAPITRE 4

Impact des nanoparticules d'oxydes de fer sur un sol contaminé par un mélange d'éléments traces et nanophytoremédiation par le tournesol.

Effect of IONPs on multimetal contaminated soils and phytoextraction by sunflower

Léa Mounier^{a,b}, Mathieu Pédrot^b, Martine Bouhnik-Le-Coz^b, Francisco Cabello Hurtado^{a*}

^aUniv Rennes 1, CNRS, ECOBIO, UMR 6553, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

^bUniv Rennes 1, CNRS, Géosciences Rennes, UMR 6118, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

* Corresponding author. Phone: +33 2 23235022. Email: francisco.cabello-hurtado@univ-rennes1.fr

Abstract

This study assessed the phytotoxicity of a mixture of five different trace elements (TEs) frequently found as pollutants in soils: arsenic, cadmium, copper, lead and zinc. On the other hand, the plant response to a magnetite (Fe_3O_4) nanoparticle (NPs) amendment on this mixture as well as nanomagnetite remediation potential has been tested. Sunflower (*Helianthus annuus*) plants were grown for 90 days in soil contaminated with the five mentioned TEs at the limit levels of TEs in sludge and in soils likely to receive sludge established by French legislation. Depending on the conditions, experimental set-ups were amended or not with 1% dry weight nanomagnetites, citric acid-coated nanomagnetites or micro-sized magnetite in order to assess NPs behavior in a TEs contaminated water-soil-plant system under repeated water-deficiency stress. The mixture of TEs did not induce phytotoxicity as estimated by plant growth, pigment content, maximum quantum yield of photosynthesis, oxidative impact and antioxidant response. Furthermore, both nanomagnetite treatments in a TEs contaminated soil significantly increased biomass production by 64 % compared to control and antioxidant enzyme activities compared to control and TEs-treated plants. Nanomagnetites particularly enhance phytoextraction of Cd and Cu, increasing the amounts of TEs in aerial parts from 1.5 to 4.5 times compared to set-ups without nanomagnetites. Based on Cd, Cu, Pb and Zn contents in soil solutions, both nanomagnetites treatments improved TEs phytoextraction without increasing groundwater contamination. On the contrary, nanomagnetites significantly reduce arsenic uptake by plants and solubilization in dissolved phase. Our results show that modifying surface physico-chemical properties of Fe_3O_4 NPs with citric acid coating does not improve their effects compared to bare Fe_3O_4 NPs. Magnetite nanoparticles also appear to mitigate the effects of drought stress. This work highlights several positive environmental aspects related to the use of nanomagnetites in phytoremediation.

1. Introduction

Anthropogenic activities such as increased urbanization, industrialization, transportation, agriculture, exploitation of mining resources and unsuitable waste management are responsible for an increase in the contamination of soil environment by trace elements (TEs) (Hou *et al.* 2020). Most often, soil TE contamination results from the repetition of single-metal and especially multi-metal pollution events, with associated adverse impacts on soil quality. While Pb, which is a known and widespread TE for centuries, remains one of the main concerns, many other TEs are on the rise and therefore require a thorough monitoring. Pb, Cd, Zn and Cu are the most environmentally concerning TEs and have been often reported in contaminated water, soil and chain food (Webber 1981). Thus, in 2003, Singh *et al.* (2003) estimated in their review at 783,000 t (Pb); 1,350,000 t (Zn); 939,000 t (Cu) and 22,000 t (Cd) of TE released each year in the environment worldwide. This increase in TEs in the environment is not without consequences for human and ecosystem health. Numerous studies have been done on the toxicity of individual metals to living systems in the environment (Cao *et al.* 2007; Demangeat *et al.* 2021; Khan *et al.* 2018; Long *et al.* 2003). Although Zn and Cu belong to the group of essential trace elements for some living beings, they become toxic beyond a certain threshold (Long *et al.* 2003). On the contrary, Pb, Cd and As are not essential for organisms' metabolisms and can cause severe damage even at low concentration depending on the environmental and pedologic factors (Perl 2020). Among TEs, Cd and As are considered as one of the most toxic pollutants and has deleterious effect at minimal doses (Järup & Åkesson 2009). Cd and As are non-essential element for plants with high-mobility and persistent toxicity in environmental media, which cause harmful effect on plant growth and finally enter the human body through the food chain (Ismael *et al.* 2019; Patra *et al.* 2004).

Trace elements speciation heads directly their mobility, bioavailability and toxicity in soil (Hooda 2010) and is influenced by physicochemical conditions of the environment (Balistrieri & Mebane 2013; Prato *et al.* 2008; Valentino-Álvarez *et al.* 2013). TEs toxicity in plants results in two types of symptoms: (i) through disturbing mineral nutrition of plants by competing for essential nutrients uptake (Benavides *et al.* 2005; Yruela 2005), and (ii) accumulation into plant tissues and cells inducing plant general metabolism disruption (Hasan *et al.* 2009; Rout & Das 2003). Worldwide, country authorities' have thus set safety standards according to the

different TEs in order to guarantee a minimum protection of the environment (Wu *et al.* 2016). However, these standards are set by assuming that interactions between TEs species are minimal and that, if there is any interaction, their level will not exceed the applied safety factors (Jadhav *et al.* 2007). If the impact of each of these TEs on plants is now well known, to date, few long-term studies have been conducted on metal cocktails. Often, they are mixtures of two or three TEs or short ecotoxicity studies of a few days, but rarely on the behavior and fate of the TEs followed during several months. For instance, it is known that Zn and Cd are usually co-contaminants (Hooda 2010). Yet, ecotoxicity tests are key tools in the study of the fate and bioavailability and to assess the potential ecotoxicological effects of TEs as well as their possible transfer to the other compartments such as groundwater, or even their transfer to the food chain. The toxicity of TEs is now well studied in many organisms (plants, animals, humans) but the limits of toxicity remain somewhat arbitrary because it depends on many parameters (e.g. concentrations, duration of exposure, chemical and physical forms, bioavailability, organisms). Also, TEs are often found in mixture in the environment, which could lead to a cocktail effect potentially more toxic for organisms than when they are found alone (Baderna *et al.* 2015). Furthermore, in their review, Santa-Cruz *et al.* (2021), highlighted that TEs were more toxic when studying in artificially contaminated soils compared to in anthropogenically contaminated soils. Thus, the establishment of regulatory thresholds for TEs contamination alone in soils does not appear to be the only parameter to be considered in assessing the health of polluted ecosystems (Tapia-Gatica *et al.* 2022).

In the past few years the use of iron oxide nanoparticles (IONPs) has been growing and number of studies have revealed their potential of application in soil and water remediation and for mitigating the phytotoxicity of TEs (Latif *et al.* 2020; Mounier *et al.* 2023; Rizwan *et al.* 2021; Tang *et al.* 2003). Indeed, due to their physico-chemical properties and high surface area, IONPs are promising materials to impact mobility, availability and toxicity of TEs (Komárek *et al.* 2013). In addition, the presence of IONPs could both influence the absorption and accumulation of TEs in plants, as well as enhance plant growth through improved nutrition and fertilization (Fahad *et al.* 2020; Kah *et al.* 2019; Konate *et al.* 2017; Rahman *et al.* 2022; Rui *et al.* 2016). To limit the agglomeration of IONPs a coating is sometimes realized with various molecules such as citric acid. By modifying the physicochemical surface properties of IONPs, it allows to increase their colloidal stability by reducing aggregation, diffusion in porous

medium and adsorption mechanisms (de Sousa *et al.* 2013). Citric acid addition is also known to improve plant growth and biomass as well as reduce phytotoxicity of TEs (Bhat *et al.* 2022; Farid *et al.* 2017). To take advantage of the potential of IONPs for remediation, issues concerning IONPs availability, biocompatibility and behavior in soil and soil solution, as well as their impact on TEs behavior in a TE-mixture context, need to be further investigated. In the current study, we have selected sunflower (*Helianthus annuus*) to work with for both its capacity to stabilize, absorb and accumulate several amount of TEs, its important biomass production, and its capacity to resist periods of water stress (Karam *et al.* 2007). The aims of this experiment were to study the behavior in a water-soil-plant system of both IONPs and a mixture of TEs, and assess TEs phytoremediation capacities of sunflower when using IONPs with and without organic coating. IONPs ability to protect plant culture under TEs pollution and repeated periods of mild water stress has also been investigated.

2. Materials and methods

2.1. Iron oxide nanoparticles synthesis

Synthesis of iron oxide nanoparticles has been performed in aerobic condition using co-precipitation method (Demangeat *et al.* 2018; Massart 1981). Mixture of FeCl₂ and FeCl₃ solutions (1:2 molar ratio) into NaOH leads to IONPs formation, namely magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles (NPsMagn). After solid phases washing with ultrapure water, final solution obtained consisted of a non-stoichiometric magnetite Fe_{3-δ}O₄ with a Fe^{II}/Fe^{III} ratio between 0.15 and 0.1 which was determined by spectrophotometric method detailed by Jungcharoen *et al.* (2021). The size, shape, surface area and pH_{ZPC} of NPsMagn were determined according to the methods described in Demangeat *et al.* (2020). Thus, the synthesized NPsMagn have a round crystalline shape of 9±2 nm diameter (ESI Figure S1) with a specific surface area and pH_{ZPC} respectively established at 115 m² g⁻¹ and 6.2. Coating of NPsMagn with citric acid (NPsMagn@CA) was achieved by adding 5 mM citric acid to the NPsMagn (ratio 1:20 (w/w)). Micrometer-sized magnetite (μPs) solution was prepared by diluting magnetite (310069 Sigma-Aldrich) in ultrapure water to the desired concentration.

2.2. Experimental design

Sunflower plants (*Helianthus annuus*) were cultivated during 90 days for this experiment. The experimental set-up used consisted of two nested pots (400 mL polypropylene beaker, Nalgene). The top pot contains the soil (335 g DW per pot) and a nylon cloth (31 μm diameter)

was added to the bottom of the top pot to hold the soil particles in the higher part of the system. The top pot was pierced to allow soil solution to run out and be collected in a second pot (ESI Figure S2). Soil was collected on grove's type site (GPS location 48.118375, -1.639370) between the 10 to 20 cm-deep first horizon, homogenized and sieved to 5 mm diameter. Soil pH was measured at 6.08 and 335 g dry weight (DW) were added per pot. Soil characteristics were carried out by the LABOCEA analysis laboratory (Combourg, France) and are given in Annex 1. The chemical analyses of the soil were performed at the Service d'Analyse des Roches et des Minéraux (SARM, Nancy, France). The major and trace element concentrations were determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES, Thermo ICap 6500) and by ICP-mass spectrometry (Thermo Elemental X7) respectively. The samples were digested by alkaline fusion using lithium metaborate (LiBO_2) addition as a fusion flux as described in Carignan *et al.* (2001). The major and trace element concentrations are given in Table S1 and initial amount of Zn ($144 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$), Pb ($53.8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$), Cu ($32.9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$), Cd ($0.31 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) and As ($9.12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) were measured.

Five treatments of six replicates each has been established: unmodified soil (Control), soil contaminated with added Zn(II), Pb(II), Cu(II), Cd(II) and As(V) (TEs), soil contaminated with TEs and containing 1 % NPsMagn (NPs-TEs), soil contaminated with TEs and containing 1 % NPsMagn coated with citric acid (NPs@CA-TEs) and soil contaminated with TEs and containing 1 % of micrometer-sized magnetite (μPs -TEs). In addition, some of the treatments have also been performed without plants (three replicates each), namely TEs (Soil TEs), NPs-TEs (Soil NPs-TEs) and NPs@CA-TEs (Soil NPs@CA-TEs) treatments. Firstly, pristine soil has been contaminated with a mixture containing five TEs, each one concentrated at the corresponding limit levels of TEs in sludge and in soils likely to receive sludge established in France (Journal Officiel République Française 1998) (**Table 1**) and carefully homogenized. This study was thought of as an accidental input of TEs into the environment that would add to the TEs already present, the initial concentrations are given in Table 1. Control soil received an equivalent dose of nitrate and sulfate to that added to the TE-contaminated soil. NPsMagn solution or NPsMagn@CA solutions have been added to achieve 1 % (m/m) in dry soil in order to provide a consistent amount of NP material to achieve an optimal removal of TEs in soil according to Komárek *et al* (Komárek *et al.* 2013). Likewise, micrometer-sized magnetite solution has been added into soil up to 1 % (m/m) in dry soil.

Table 1 Trace elements threshold in soil (mg kg^{-1} DW), TEs concentration added in pot (mg pot^{-1}) and final TEs concentration (mg pot^{-1}).

	Zn	Pb	Cu	Cd	As
Initial [TE] in soil (mg kg^{-1})	144	53.8	32.9	0.31	9.12
TE threshold (mg kg^{-1})	300	100	100	2	35
Chemical form added	Zn(SO ₄)	Pb(NO ₃) ₂	Cu(NO ₃) ₂	Cd(NO ₃) ₂	As ₂ O ₅
[TE] added (mg pot^{-1})	100.5	33.5	33.5	0.67	11.73
[TE] final (mg.pot^{-1})	148.7	51.5	44.5	0.8	14.8

At the beginning of the experiment, sunflower seeds were surface sterilized during 3 min in a 3 % sodium hypochlorite bath and then seeds were rinsed five times for 12 min in deionized water. Using a climatic chamber, seeds were initially sown into pristine soil and after 28 days of growth, were transferred into experimental set-up. Cyclic growth parameters of climatic chamber allowed 16 h light at 21 °C and 8 h dark at 18 °C, a photosynthetic photon flux density of $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a relative humidity of 70 %.

Soils of the different treatments were kept for 4 days each week at field capacity using a 0.5 mM NaCl solution, alternating with periods of 3 days of water deficit (absence of irrigation). Every two weeks, soil solution has been collected by increasing irrigation. For pots cultivated with plants, soil solutions collected from two replicates were merged and homogenized at each sampling allowing to obtain a sufficient volume so that three samples were generated for geochemical analyses. In the case of the soil solutions of non-cultivated pots, two samples were generated by dividing soil solution of the second pot in two halves and then each half was homogenized with soil solution of pots 1 and 3 respectively.

After 90 days of culture, sunflower plants were harvested in order to perform geochemical and biological analyses. Pictures have been taken, fresh weights of roots, stem, leaves and flower buds were measured for each individual and samples were finally frozen into liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.3. Biological assays

For biological analyses purposes, sunflower samples were firstly lyophilized (Christ ALPHA 1-2LDplus) where frozen samples were put into chamber to follow an initial long drying (0.09 Pa for 72 h), followed by a second stage of short dry (0.001 Pa for 24 h). Dried plant samples were then crushed with a mill (Mixer Mill MM400) using zirconium bowls and beads.

2.3.1. Lipid peroxidation determination

Hodges *et al.* (1999) corrected method was followed to quantify the lipid peroxidation products by measuring thiobarbituric acid reactant species (TBARS). 15 mg dried leaves were mixed with 1 mL ethanol (80 %) and let react in a rotative wheel at room temperature for 25 min. Samples were then centrifuged at 10 000 *g* for 10 min and supernatants were collected into new tubes. Two aliquots of 200 μ L were prepared and added with 200 μ L of TBA+ solution (20.0 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.65 % (w/v) TBA and 0.01 % (w/v) butylhydroxytoluene). Two others aliquots were mixed with TBA- solution (20.0 % (w/v) trichloroacetic acid, 0.01 % (w/v) butylhydroxytoluene). Samples were heated at 95 °C for 25 min and then centrifuged for 10 min at 10 000 *g* after cooling at room temperature. Supernatants were recovered in new tubes, and 300 μ L were placed in microplate wells. Sample absorbance was read at 440, 532 and 660 nm (spectrometer SAFAS FLX-Xenius) and results were expressed in malondialdehyde equivalents (MDAeq) per gram of plant DW according to Hodges *et al.* (1999) equations.

2.3.2. Extraction and quantification of soluble proteins

To extract soluble proteins, 50 mg dried leaves were mixed with 1.5 mL sodium phosphate buffer (50mM, pH 7.5) containing 1mM Na-EDTA, 5 % (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.5 % (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma-P9599) and 0.1 % (w/v) Triton X-100. Samples were placed at 4 °C for 1 h with constant agitation, and then supernatants were collected in new tubes after samples were centrifuged twice at 12 000 *g* for 12 min. Bradford's method (Bradford 1976) was followed to quantify soluble protein by spectrophotometric measurements. Bovine serum albumin (BSA) was used to determine the protein contents (calibration solution range from 0.1 to 1.4 mg L⁻¹). Protein extracts were kept at -80 °C until used for POD and SOD enzymatic antioxidant activity assays.

2.3.3. POD activity determination

To determine guaiacol peroxidase (POD) activity, modified literature was followed (Cakmak & Marschner 1992). In microplate wells were mixed 190 μL deionized ultrapure water, 30 μL potassium phosphate buffer (1 M, pH 6.5), 30 μL guaiacol (150 mM) and 50 μL soluble protein extract. Reaction started with the addition of 30 μL of H_2O_2 (160 mM) and monitored by reading absorbance at 470 nm ($\epsilon_{\text{tetraguaiacol}} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) for 6 min. The observed increase in absorbance provided the maximum rate of tetraguaiacol formation and was used to determine the enzymatic activity. The amount of enzyme that reduced 1 μmol of H_2O_2 per min corresponds to 1 unit (U) of POD under the assayed conditions.

2.3.4. SOD activity determination

To measure superoxide dismutase (SOD) activity, which consist of the enzyme capacity to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT), the modified method of Giannopolitis and Ries (1977) was followed. Reaction occurs in microplate well where reaction mixture consists of 175 μL deionized ultrapure water, 30 μL potassium phosphate buffer (500mM, pH 7.8), 30 μL of methionine (130 mM), 30 μL of NBT (750 μM) and 5 μL of soluble protein extract. Two microplates were prepared, one exposed to light and one kept in the dark (for light-independent reactions corrections) for spectrometric analysis and a pre-reading of each plate was realized at 560 nm before initiating the reaction. To start the reaction, 30 μL of riboflavin (20 μM) were added in each well and samples were exposed either to light (30 min) or kept in the dark. Absorbance lecture was realized at 560 nm, and pre-read values were subtracted from the final absorbance measurement. SOD activity has been expressed in U mg^{-1} protein, "U" corresponding to the amount of enzyme causing 50 % inhibition of the NBT reduction to blue formazan observed in the absence of the enzyme.

2.4. Leaf angle measurements

Photos used for the measurement of leaf angle were taken twice a week at the beginning and the end of water stress periods. Leaf inclination angle were measured using the ImageJ software and corresponds to the angle between the abaxial face of the leaf and the petiole (measurements were made on four leaves per plant).

2.5. Water content

Shoot water content was determined following the equation: $WC = ((FW-DW) * 100)/FW$, where FW and DW respectively correspond to the fresh weight and dry weight of plant sample.

2.6. Geochemical analyses

Redox potential and pH measurements were realized using respectively a Pt electrode combined with a Ag/AgCl reference electrode calibrated using a standard commercial redox buffer (220 mV vs. Ag/AgCl) (Fisher Scientific Bioblock) and Mettler InLab electrode after a calibration with 3 standard buffers (pH 4, 7, and 10). For geochemical analysis, soil solutions were filtered at 0.2 μm with syringe filters to remove particles and 10 mL of the filtered solution have been used immediately for trace element measurements. The remained solutions were stocked at 4 °C. Samples preparation took place in clean room and pre-washed tubes (24 h in 1.5 M HNO_3 at 45 °C, 24 h in deionized ultrapure water at 45 °C) were used.

For biological analysis, plant samples preparation consisted of mixing 100 mg DW with 5 mL 14.6 M HNO_3 , 1 mL 37 % H_2O_2 and 1 mL ultrapure water in specific digestion tubes (Anton Paar Teflon 18 mL vials). Samples were digested using a multiwave (Multiwave 7000 Anton Paar) following specific steps: (1) increasing temperature to 250 °C for 20 min at 140 bars, (2) keeping temperature at 250°C for 30 min at 140 bars. Then, the digested solutions were transferred into digestion vessels (Savillex Teflon vials) and were heated until evaporation. Dry samples were solubilized in 0.37 M HNO_3 with appropriate dilution(s) considering ICP-MS quantification limits.

2.6.1. Trace elements measurements

Trace elements were measured by ICP-MS (Agilent 7700x) using rhenium and rhodium as internal standards and SLRS-6 was used as international geostandard to check the validity and reproducibility of the results. Typical uncertainties including all error sources were below ± 5 % for all the trace elements, whereas for major cations, the uncertainty lay between 2 and 5 %, depending on the concentration.

2.7. Statistical analysis

For data statistical analysis, 3 replicates minimum were used and each value is presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Shapiro test and Bartlett test were applied to respectively confirm normality a homoscedasticity for each assay. Statistical analyses were conducted using the Tukey test (ANOVA) or Kruskall Wallis test to assess the significance of the means taking $p < 0.05$ as significant. Data significantly different are indicated with different letters.

3. Results and discussion

3.1. Physiological and biochemical responses of sunflower plants exposed to nanomagnetites in a multimetal pollution context

3.1.1. Growth parameters

Overall, after 90 days of growth, no significant differences in plant height were observed among treatments and only NPs-TEs treatment significantly decreases plant height by less than 8% compared to control (**Figure 1**). On the contrary, control plants biomass was the lowest observed (**Figure 1**). NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments are those whose plants produced significantly more total aerial biomass. However, no difference between the two of them is to be noted, whereas one would expect from reading the literature some beneficial effects of citric acid on plant development. Indeed, it was reported that both NPs coated with citric acid and free citric acid increases plant growth and biomass production under with or without TEs pollution (Bhat *et al.* 2022; Bilal Shakoor *et al.* 2014; Iannone *et al.* 2021). Detailing each part of the plant, no significant difference was observed for either leaves or stems fresh weight between the different conditions except for control plant which was the lowest and up to 20% and 35% below stems and leaves biomass in NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments, respectively. However, the presence of nanoparticles in both treatments significantly enhanced flower biomass (**Figure 1**). An estimate of root biomass was made because the whole roots could not be precisely and equally recovered from the soil (ESI Figure S3). That being said, though, determined root biomass and visual observation of roots provided a sufficient base to note that root growth was not impacted by TEs contamination combined or not with other treatment. All this may at first appear to be in contrast to literature concerning

the effect of TEs on plants (Ashagre *et al.* 2013; Boonyapookana *et al.* 2005; Demangeat *et al.* 2021; Yoon *et al.* 2015). In their multi-contaminated TEs study to assess the short-term phytotoxicity of As, Cd, Cr, Pb, Hg, Ni and Zn applied to limit concentrations set in Italy (similar to French limits for soils likely to receive sludge) on 3 higher plants, Baderna *et al.* observed that Italian limits were acceptable for plant protection only for exposure to each TE alone, but not for mixtures containing all the concentrations of TEs specified by their respective legislative threshold (Baderna *et al.* 2015). However, here we wanted to avoid the impact on seed germination and early stages of development of seedlings, which are particularly sensitive to TEs like Pb, Cu, or Zn (Li *et al.* 2005), and thus plants were exposed to TEs only after 28 days of growth. In addition, sunflower has a greater potential for TEs tolerance than other crops (Rizwan *et al.* 2016). Plant development in the presence of TEs could also be explained by plant hormesis phenomenon (Poschenrieder *et al.* 2013). It is an adaptative compensatory process following an initial disruption in homeostasis known as the hormetic response which can be defined as a strategy, by which cells, organs, and organisms acclimate to severe challenges (Calabrese & Baldwin 2003; Calabrese & Mattson 2017). For instance, growth and yield were improved in plants treated with Cd at low concentration (Durenne *et al.* 2018; Siddhu *et al.* 2008) and aerial biomass, pigment content as well as photosynthesis efficiency increased into plants treated with Pd and Cd (Jia *et al.* 2015; Muszyńska *et al.* 2018). Here, none of the treatments affected the maximum quantum yield of photosynthesis (ESI Table S2) or the levels of chlorophylls and carotenoids (data not shown).

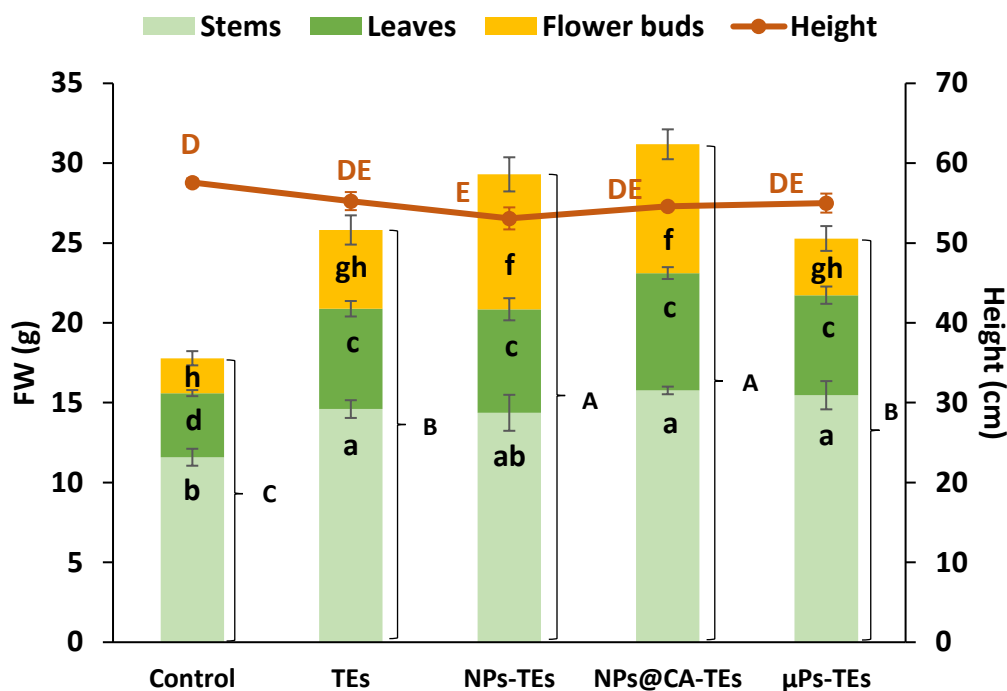


Figure 1 Fresh weight (g) and height (cm) (curve) of leaves (green), stems (light green), and flower buds (yellow) of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing TEs, NPs-TEs, NPs@CA-TEs or μ Ps-TEs. Data represent the mean \pm SEM (n= 6). Different letters above indicate significant differences ($p < 0.05$).

Furthermore, our results point up that biomass of plant treated with both nanomagnetites-TEs treatments are even higher than those in TEs and μ Ps-TEs. Previous studies already demonstrated the improvement of growth and biomass production of several type of plants treated with NPsMagn (Hussain *et al.* 2019; Palmqvist *et al.* 2017; Rizwan *et al.* 2019; Tombuloglu *et al.* 2019). IONPs is also a source of Fe fertilizer as Fe from NPsMagn released in soil (see section 3.2.2) stimulates the biosynthesis of chlorophyll and redox process in plants which may positively affect the plant growth (Kermeur *et al.* 2023). However in our case, amount of Fe in aerial part of sunflowers is only significantly higher in one of two of the NPsMagn-TEs treatment (see section 3.2.1).

Interestingly, it is worth to be noted that flower bud biomass in plants treated with TEs in the presence of both types of nanomagnetites solutions were significantly four times higher than control plants. Indeed, at the end of the experiment four out of six buds were blooming compared to none out of six in the case of control. Similar results were observed in our laboratory where sunflower treated with NPsMagn bloomed earlier than those under other

conditions (Mounier *et al.* 2023). Few studies reported accelerated flowering with NPs. Hussain *et al.* (2019) showed that wheat plants treated with Fe₃O₄ NPs reached at booting and heading stages earlier than control and that these treated plants matured earlier than control ones. However more research are needed to understand the underlying physiological mechanisms (Lawre & Raskar 2014; Zahedi *et al.* 2020).

Finally, we come to wonder if this increase in biomass and earlier maturation of plants is positive or negative? As often happens, it is context dependent. From a phytoremediation point of view, the increase in biomass production is a positive consequence because it increases the absorption of contaminants in the aerial parts. Consequently, soil decontamination becomes more efficient. From an agronomic point of view, an increase in biomass allows for an increase in grain size and yield to feed a growing population. Also, an earlier maturation and an accelerated flowering would allow to avoid crop losses linked to climatic events such as drought stress or heat waves which are becoming more frequent. However, question of synchronization of life cycle of pollinators linked to the flowering of certain plants arises. Flowering too early could in some cases be unfavorable to pollination and threaten the survival of these insects and the balance of biodiversity.

3.1.2. Oxidative stress response

TBARS content reflects the degree of oxidative damage to a plant cell, the decreased TBARS content is inferred to result from the protective effect of plant responses against lipid peroxidation. TBARS content in NPs-TEs treated plants is similar to control plants, while this amount is significantly higher by 18 %, 19 % and 25 % in TEs, NPs@CA-TEs and μ Ps-TEs treatments compared to control (**Figure 2A**). We have shown in previous studies a protective effect of nanomagnetites against lipid peroxidation provoked by lead treatment of sunflower plants (Demangeat *et al.* 2021; Mounier *et al.* 2023). Here, neither NPsMagn nor NPsMagn@CA allow to reduced oxidative stress leading to lipid peroxidation caused by exposure of sunflower plants to a cocktail of five TEs.

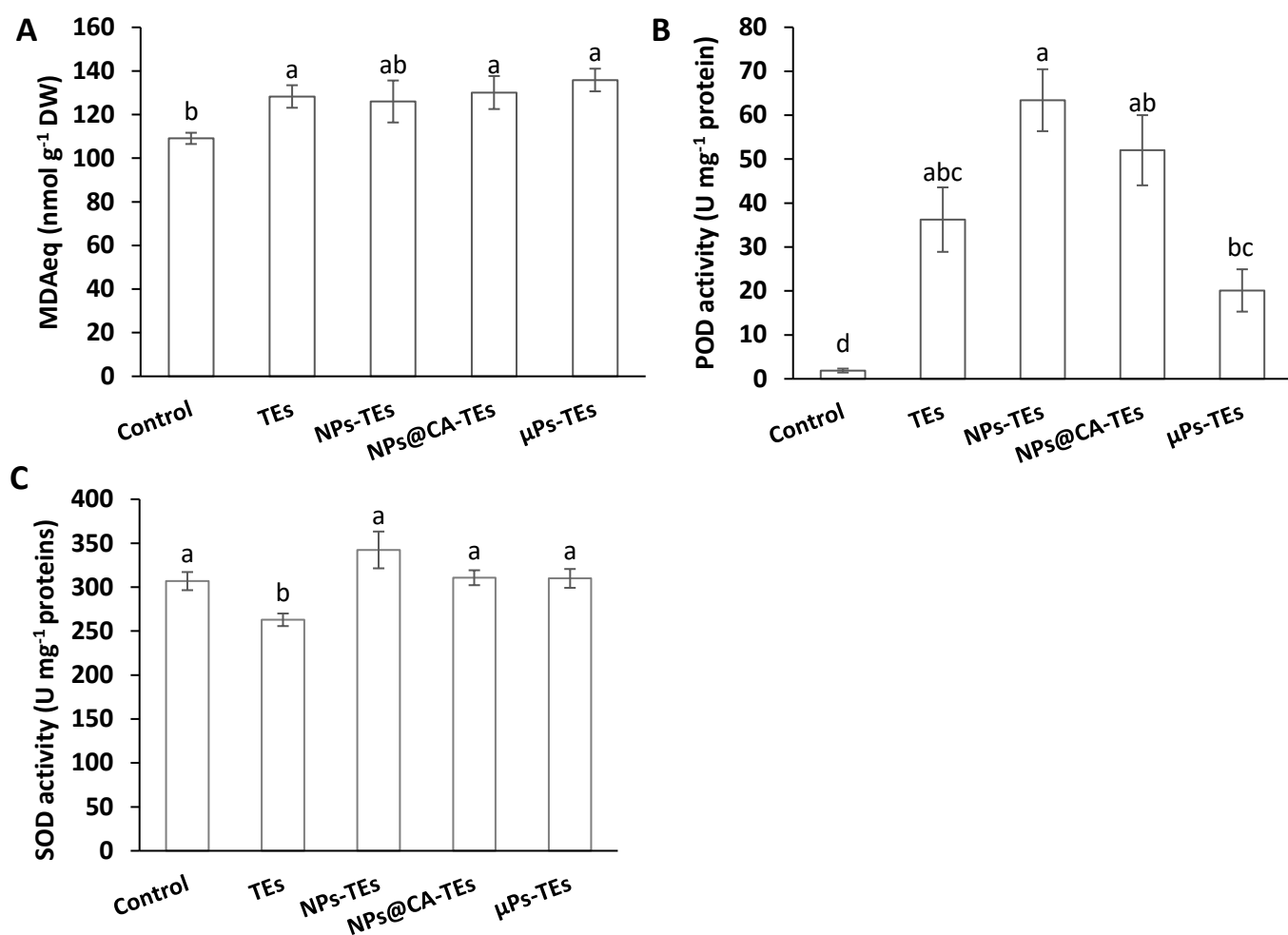


Figure 2 Lipid peroxidation and antioxidant activities measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth on control soil or containing TEs, NPs-TEs, NPs@CA-TEs or μ Ps-TEs. (A) TBARS content (nmol MDAeq per g DW); (B) POD activity (U mg⁻¹ protein) and (C) SOD activity (U mg⁻¹ protein). Data represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

POD and SOD are part of the enzymes that participate in protection mechanisms against oxidative damage. POD activities increased significantly (from 11 to 34-fold) in each treatment in comparison to control (**Figure 2B**). Maximum activities are found in NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments (reaching respectively 63 and 52 U mg⁻¹ protein). No significant differences were observed in SOD activities between treatments, except in TEs treatment whose SOD activity decreased by 14 % compared to control (**Figure 2C**). Once again, maximum activities are found in NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments (reaching respectively 342 and 310 U mg⁻¹ protein). Disruption of redox homeostasis triggers signaling pathways in cells, resulting in

acclimation to conditions triggered by abiotic stresses (Muszyńska & Labudda 2019). Thus, NPsMagn may activate antioxidant mechanisms that can help plants that grow under stressful conditions. Data in the literature show that the balance or imbalance between ROS production and detoxification could due to NPs application can be multifactorial. Iannone *et al.* (2016) reported an increase of POD activity in shoot and roots of wheat in each of the NPsMagn treatment tested. In general, they observed that NPs produced an increase in the antioxidant enzyme activities, thus preventing the potential oxidative injure in plant tissues. The results support their suggestion that NPsMagn could act as a signaling molecules and induced antioxidant response system in distant tissues.

3.2. Fate of nanomagnetites and TEs mixture in a water-soil-plant system

3.2.1. Effect of Fe₃O₄ NPs on TEs remediation by sunflower

Iron uptake. On the one hand, our results show that there are few differences in total amount of Fe except for NPs-TEs treatment, which significantly accumulate more iron in the aerial parts (**Figure 3A**). On the other hand, differences in aerial parts are observed for treatments containing both nanomagnetites and TEs with a higher Fe accumulation in stems and flowers compared to control. Generally, iron accumulates preferentially in stems compared to leaves and flower buds. The low Fe total content in NPs@CA-TEs plants could be explained by a higher biomass for similar amounts of Fe, thus causing a dilution of Fe. As it can be seen in **Figure 3A**, total amount of iron in leaves and stems of plants treated with NPs@CA-TEs is not different from the control group. TE mixture did not decreased Fe quantity absorbed by sunflowers and, on the contrary, a significant increase is observed for NPs-TEs modality.

Furthermore, NPs@CA-TEs treatment didn't allow to increase Fe content in sunflower despite a higher Fe mobility in soil solution (**Figure 4A**) (see section 3.2.2.). Citric acid (which has three carboxyl groups and one hydroxyl group) is adsorbed on the surface of IONPs by forming a carboxylate group with the Fe-OH molecules present on the surface of the nanoparticles, leaving one or two negatively charged carboxyl groups; thus potentially decreasing the NPs-roots interaction and NPs uptake by plants (de Sousa *et al.* 2013). On the other hand, significantly higher amount of iron in the aerial parts of plants in the NPs-TEs treatment (**Figure 3A**) could traduce some extent of Fe₃O₄ NPs adsorption and penetration into roots. This phenomena has already been evidenced in previous studies (Demangeat *et al.* 2021; Mounier

et al. 2023). Due to their size, NPs can penetrate to roots and follow both symplastic and apoplastic pathway following water flow (Pérez-de-Luque 2017).

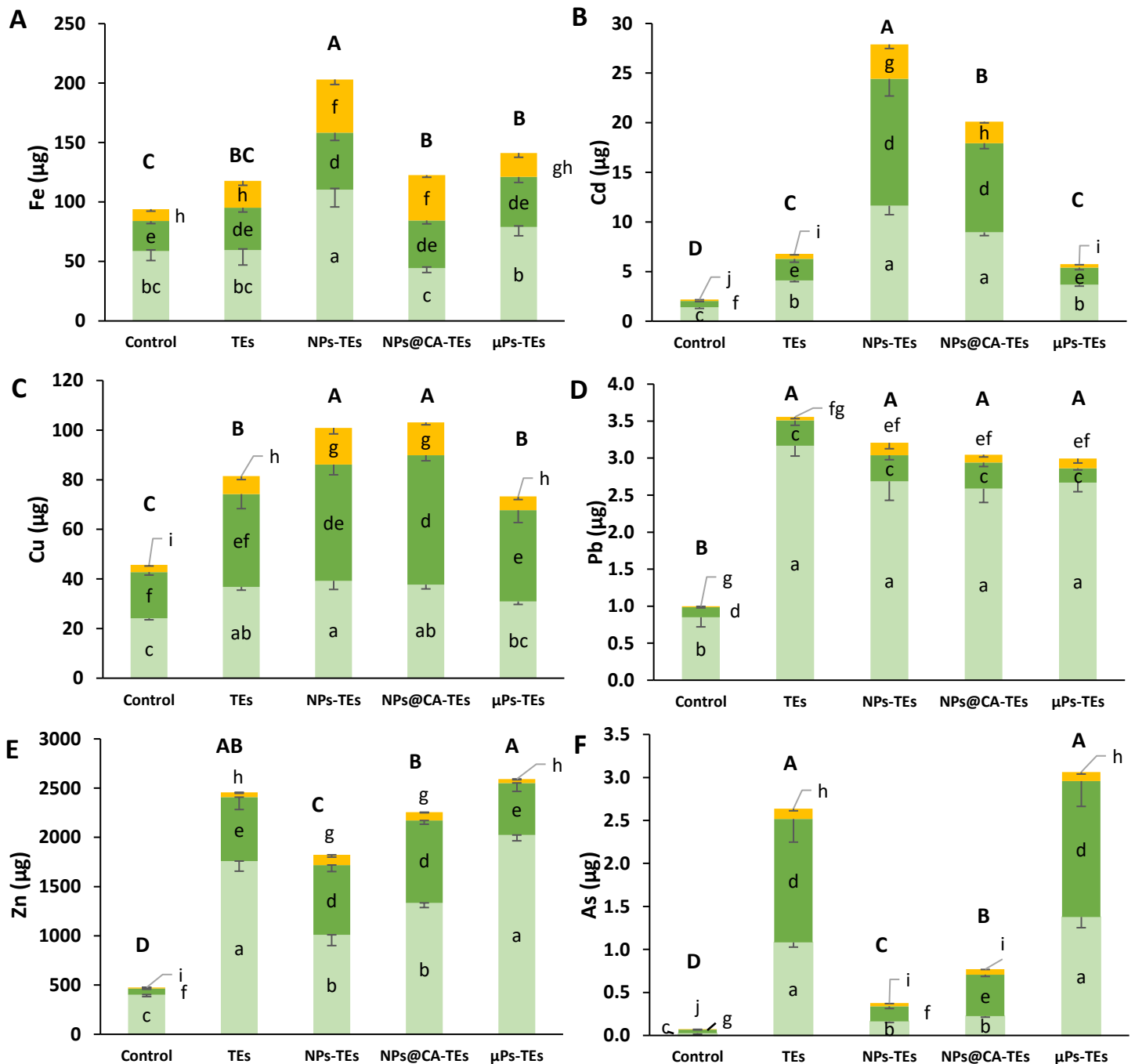


Figure 3 Iron and trace elements quantity (μg) in stems (light green) leaves (green) and flower buds (yellow) measured by ICP-MS after 90 days of growth in the different studied soils. (A) Fe; (B) Cd; (C) Cu; (D) Pb; (E) Zn; and (F) As. Data represent the mean \pm SEM ($n=6$). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

TEs remediation by sunflowers. A mixture of five TEs was introduced into the soil in order to study their behavior and fate in the different compartments of our experimental set-up. However, each TE does not necessarily have the same behavior (i) as the other TEs in the set-up and (ii) as a single TE in the soil in a pollution context. The absorption of TEs depends mainly on the speciation of the element in the medium which is influenced by environmental conditions such as pH, redox conditions, dissolved organic carbon content or concentrations of major ions (Balistreri & Mebane 2013; Prato *et al.* 2008; Valentino-Álvarez *et al.* 2013). As it can be seen in **Figure 3**, amounts of each TE extracted by sunflowers in the TEs treatment is consistently significantly higher than the control group.

Firstly, detailing fate of each TE apart, our results show that (i) Cd and Cu have a similar behavior and (ii) the presence of nanomagnetite in the soil increases the extraction of these TEs by plants. Both Cd quantity (**Figure 3B**) and content (ESI Figure S4) are significantly increased in stems, leaves and flower buds of sunflowers in each treatment with nanomagnetites. Thus, total Cd contained in all aerial part is four and three times higher than TEs respectively in NPs-TEs and NPs@CA-TEs. We observed a similar behavior for Cu total quantity whose results show that plants treated with both NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments significantly accumulate from 8 % to 54 % more Cu in their aerial parts compared to all other treatments combined (**Figure 3C**). Copper accumulates mainly in leaves of sunflower where it is 25 % to 40 % higher respectively in NP-TEs and NPs@CA-TEs treatments compared to TEs. The amounts of Cu contained in flower buds of NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments are significantly higher than in all the other treatments due to increased flower buds biomass in presence of nanomagnetites resulting in a significantly greater quantity extracted than in TEs and μ Ps-TEs treatments, which are similar to each other. Furthermore, this lack of difference between the TEs and μ Ps-TEs treatments tends to demonstrate that our observations concerning the effect of nanomagnetites on Cd and Cu accumulation is linked to the size of the magnetite particles and not to the presence of Fe. Copper accumulation in plants treated with NPsMagn and Cu has been previously demonstrated in our laboratory, and the aerial Cu concentrations are of the same order of magnitude (ESI Figure S4) (Demangeat *et al.* 2021). However, the addition of NPs@CA had not been tested and our results show that, although there is no difference with the NPsMagn treatment, it also increases significantly the extraction of Cu by the sunflower compared to the other modalities. For Cd, NPs@CA-TEs did

not provide the expected result since the amount in plant was significantly lower than that after the NPs-TEs treatment.

In the soil, Cd is mainly present in the exchangeable and carbonate fractions, as well as bound to organic matter (Crea *et al.* 2016; El-Naggar *et al.* 2018). Soluble and exchangeable fraction is considered bioavailable to plants. Non-residual fractions (oxydes, carbonates, and organic matter fractions) would also be bioavailable when soil pH and redox potential (Eh) are modified locally or on a larger scale (Rinklebe & Shaheen 2014). In our study no changes in soil solution pH or Eh has been observed (data not shown). Both NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments induced a strong increase of Cd in all aerial parts of sunflowers meaning uncoated and coated nanomagnetites impact Cd bioavailability in soil. However, although Cd is a very phytotoxic element, addition of other TEs simultaneously with Cd could mitigate its toxicity (Chen *et al.* 2018). Generally, studies shows a decreased in Cd uptake by plant treated with NPs when it is the only TE in soil (Hussain *et al.* 2019; Manzoor *et al.* 2021; Rahmatizadeh *et al.* 2019). In another study, it has been shown that citrate-coated magnetite NPs reduced Cd and Cr translocation and toxicity in wheat under both Cd and Cr stress alone and when combined (López-Luna *et al.* 2016). The alleviating effect of nano-Fe₃O₄ is associated with their adsorption capacity of TEs (Konate *et al.* 2017). However, this survey was performed under hydroponic conditions which may explain the difference in behavior with our experience. It is well-documented that toxic trace elements such as Cd ion enter into the plants *via* metal transporters such as Fe transporters (Hall & Williams 2003). Thus, exogenous supply of Fe may compete with Cd during uptake by roots. For instance, Fe nutrition is known to decrease Cd in rice (Bashir *et al.* 2018). Also, Cu and Cd exhibit competitive inhibition for Cu transmembrane transporter ligand (Komjarova & Blust 2009). It may affect significantly the occupation of membrane binding sites as in our study limited Cu absorption and increasing Cd uptake has been observed. Trace elements absorption into sunflowers could also be achieved via the absorption of nanomagnetite acting as Trojan horses (Deng *et al.* 2017).

Then, concerning lead uptake into aerial parts of sunflower follow the same pattern, few changes in its uptake can be noticed between the several treatments containing TE in soil. Lead quantity is distributed in decreasing order in stems > leaves > flower buds (**Figure 3D**), but no significant differences were observed in Pb amount between all treatments containing TE in the soil (**Figure 3D**). The amounts of Pb found in the aerial parts of sunflower remain

relatively low compared to other studies (Perl 2020). However, Pb mobility is influenced by a numerous soil property which govern Pb speciation. The presence of iron oxides is known to adsorb and form complexes with Pb, thus limiting its mobility (Bargar *et al.* 1997). It explains why in our case these have limited Pb uptake in sunflowers' aerial parts. In their multimetals study, Baderna *et al.* (2015) hypothesize that the response to high concentrations of TEs in a mixture differs from that theoretically obtained by summing the individual effects of the TEs. This may be due to additive effects of the TEs in the soil or to the formation of complexes between TEs, which reduce their bioavailability to plants.

Finally, Zn and As uptake into aerial parts of sunflower follow the same pattern, but each in different intensities. Nevertheless, the variation in extracted quantities follows the same pattern, and we can group together TEs and μ Ps-TEs treatments on the one hand, and NPs-TEs and NPs@CA-TEs on the other, according to TEs behavior. Zinc quantity is distributed in decreasing order in stems > leaves > flower buds (**Figure 3E**), but Zn is more concentrated in leaves when plants have grown in soil polluted with TEs (ESI Figure S4). Zinc amount in whole aerial parts significantly decreased after NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments compared to TEs and μ Ps-TEs treatments, and in particular a reduced concentration in the stems. However, Zn quantities in leaves and flower buds are higher in treatments with nanomagnetites combined to TEs (**Figure 3D**). Then, both nanomagnetites-TEs treatments reduced significantly As uptake by sunflower in all aerial part compared to TEs or μ Ps-TEs (**Figure 3F**). Our results showed a decreased of 89% and 80 % in As uptake respectively in NPs-TEs, and NPs@CA-TEs treatments compared to μ Ps-TEs. The application of the different treatments of nanomagnetite allowed to drastically limit As translocation and we notice concentrations very close to those of the control, despite the absence of spiked arsenic in the latter. However, it should be noted that total quantity of As in the whole plant as well as the foliar amount doubled in NPs@CA-TEs treatment compared to the NPsMagn-TEs. In soil, As is mainly bound to Fe and Mn oxides. Fe content in soil can thus become a major factor influencing As bioavailability as it was suggested that the presence of proportionately larger amounts of a strongly binding substrate such as iron oxides and hydroxide resulted in reduced availability to organisms (Cullen & Reimer 1989). Previous studies identified As as the most toxic element even when mixed with other TEs (Baderna *et al.* 2015; Romero-Freire *et al.* 2016). Thus, As can caused severe damage to plant (Azad *et al.* 2009; Moreno-Jiménez *et al.* 2009) and

sunflowers definitively benefit of nanomagnetite application which allow to decrease As mobility in soil (**Figure 4F**) and uptake in aerial parts (**Figure 3F**). Similar evidences of NPs capacities to enhance As stabilization and reduce its bioaccumulation have already been recently demonstrated without (Vítková *et al.* 2018; Yan *et al.* 2021) and with citric acid coating (Bhat *et al.* 2022).

3.2.2. Effect of nanomagnetites on Fe and TEs contents in soil solution

Fate of Fe. As observed in **Figure 4A**, the cumulative amount of Fe release in soil solution is 70 % and 10 % superior respectively in NPs@CA-TEs and NPs-TEs treatments than in the soil solutions of the control soil. We can hypothesis that the higher Fe loss in the NPs@CA-TEs modality is of nanoparticle origin, which can be explained by the citric acid coating which improves the colloidal stability of the NPs and by the citrate complexes formed with Fe, potentially originating from nanomagnetites, which are highly mobile forms of Fe (Jungcharoen *et al.*, in revision). However, the amount of Fe leached after 75 days in nanomagnetites plus TEs treatments represented less than 0.01 % of Fe present in soil. Those results suggested that a large amount of nanomagnetites might have been sequestered in soils during the leaching. Previous study highlighted that nanomagnetites didn't migrated over time in leachates but rather tends to aggregate to mm-sized particles or bond to organic matter (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2019; Mounier *et al.* 2023; Vikesland *et al.* 2007). These results provide answers to the environmental question of nanomagnetite dispersion in the environment as the stability of nanomagnetites avoids groundwater contamination by stabilizing the TEs in the soil, thus allowing a long-term efficiency and a reduction of the NPs exposure in the underground compartment. On the other hand, for a use linked to the presence of contaminants, this implies a low diffusivity of the Fe₃O₄ NPs in the medium and can be a limited action.

Furthermore, Fe content in soil solutions for treatments without plants were three to five times inferior than in the soil solutions of the control soil. Those observations suggest that plants take a part on Fe release into more bioavailable forms in the media. It could also be the influence of roots leading to preferential flows of larger diameter. The solubilization of Fe may be related to the presence of root exudates or to microbial activity in the rhizosphere (Bastani *et al.* 2018). Because Fe solubility is governed by soil pH, acidification of the rhizosphere through the release of protons, organic acids, and root respiration plays an important role in

mineral weathering (Mimmo *et al.* 2014). In the mobilization process, root exudates can act alone or in combination, which has an additive effect on Fe dissolution from minerals (Dehner *et al.* 2010). Thus, nanomagnetites could be an hypothetical source of Fe for plants producing root exudates.

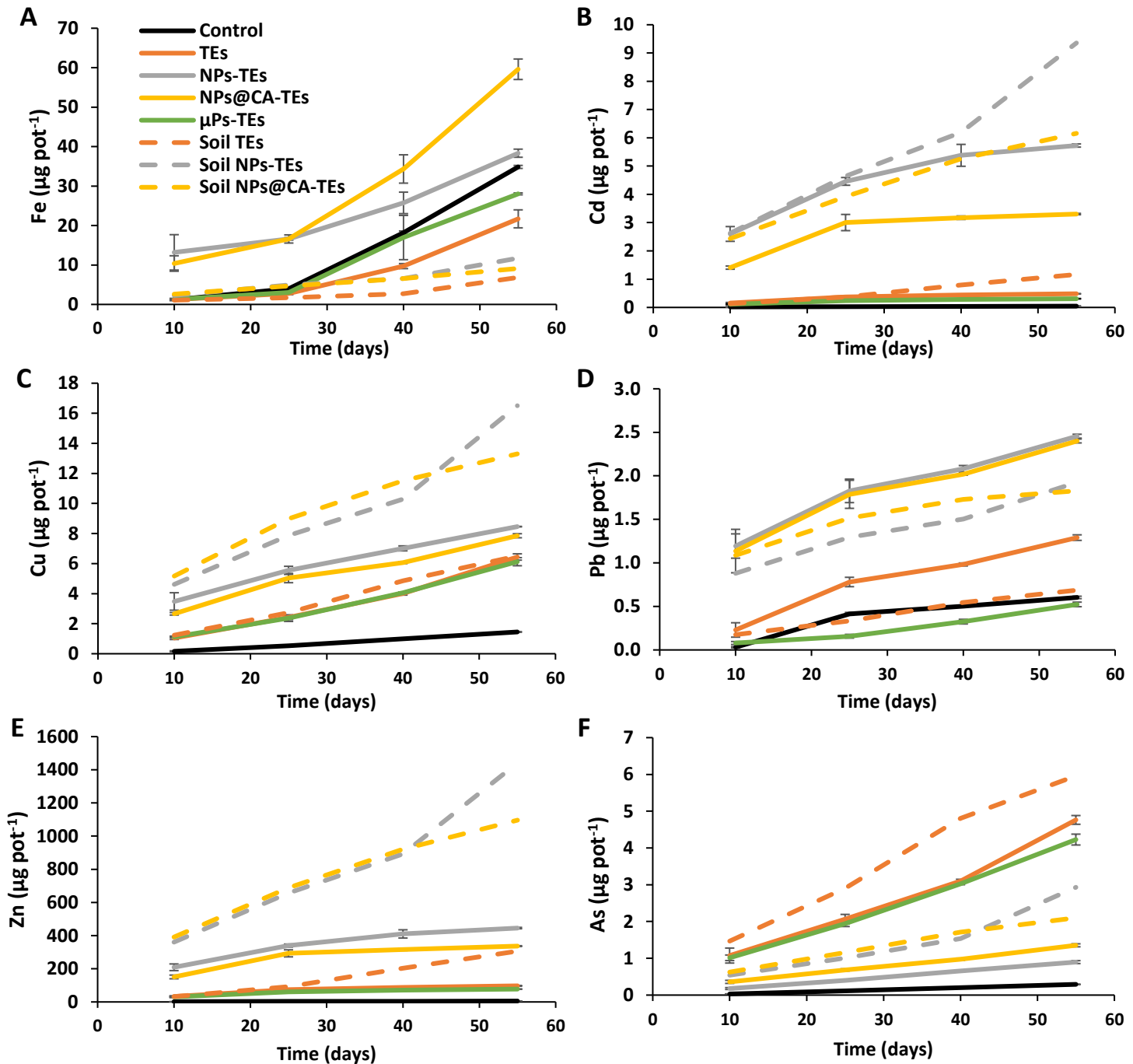


Figure 4 Cumulative amount of iron and trace elements leached ($\mu\text{g pot}^{-1}$) over the experiment (day 10 to 75) measured by ICP-MS. (A) Fe; (B) Cd (C) Cu; (D) Pb; (E) Zn; and (F) As. Dotted lines represent treatments without plant. Data represent the mean ($n=3$ (with plant) and $n= 2$ (without plant)).

TEs availability in leachates. With the input of the five TEs in the soils, several types of behavior in the soil solution can be distinguished. Firstly, the TEs (Cd, Cu, Pb, Zn) whose content in the soil solution increases in the presence of any nanomagnetites treatments. Indeed, for Cd and Zn, leachate average of both NPsMagn combined to TEs treatments with plants were respectively 4 and 9 times higher than in the soil solutions of TEs treatment, and respectively 6 and 19 times higher than in the soil solutions of μ Ps-TEs treatment (**Figure 4B,D**). However, it is worth to be noted that TEs contents lost in the leachates remain low compared to the TEs amounts in the soil, representing at most 0.1% (Zn) and 1.2% (Cd). Effects of nanomagnetites on Pd and Cu leaching is little noticeable (**Figure 4C, E**). Secondly, As quantity in leachates decreases by 81 % and 72 % in the presence of NPs-TEs and NPs@CA-TEs with plant compared to TEs and μ Ps-TEs treatments (**Figure 4F**). We can notice that the behavior of TEs in the soil solution can be grouped in the same way as in plants. For instance, Cd and Cu amount are higher in soil solution as well as in plants under nanomagnetites treatments (**Figure 3B,C**). Inversely, As amount in sunflowers follow As content in soil solution with both NPs-TEs and NPs@CA-TEs (**Figure 3F**).

Furthermore, several impact on TEs leachates can be observed between NPs-TEs and NPs@CA-TEs treatments, both with and without plant. Indeed, Zn and Cd amount in soil solution is respectively higher by 24 % and 42 % in NPs-TEs treatment with plants, and by 24 % and 34 % without plants compared to NPs@CA-TEs treatment (**Figure 4B,D**). Actually, most previous studies reveals that NPs tend to decreased TEs leaching and act as scavengers of TEs in soils (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2019; Demangeat *et al.* 2021). Citric acid coated nanomagnetites treatment was first selected as it was shown that it could enhance NPs properties and affect TEs mobility (Al-Sid-Cheikh *et al.* 2019; Rizwan *et al.* 2021). Al-Sid-Cheikh *et al.* (2019) have shown that surface composition of nanomagnetites impacts TEs mobility and may be involved in TEs transfer into groundwater. Although citric acid only had an effect on some TEs (As, Fe) in presence of plants, nanomagnetites could be a way to modify the bioavailability of certain TEs that are not easily assimilated by plants.

TEs movement in soil can be affected by numerous mechanisms (such as speciation, pH and redox potential, OM content, soil texture, soil structure or microorganisms) (Chaignon *et al.* 2002). Our results show that nanomagnetites addition act differently depending on the TEs studied and their speciation in the soil. Arsenic, present as oxyanion in soil solution in these

physical-chemical conditions, interacts little with the constituent elements of the soil as its mainly negatively charged according to its speciation. Thus, As is easily more retained in soil, notably by adsorption onto Fe phases, like nanomagnetites, known for their large capacity to bind As (Dixit & Hering 2003). In contrast, the four other TEs studied existed as cations in soil therefore interact greatly with different soil constituents such as organic molecules or mineralogical clays. Thus, nanomagnetites theoretically have less influence on their mobility because these TEs possess more affinity with others soil components depending on their chemical speciation. However, our results show that Zn, Cd, Pb and Cu leaching and solubilization have been increased in each Fe₃O₄ treatments (even if the quantities remain low). Nanomagnetites have an indirect effect on the behavior of TEs existing as cation in soil and it would be necessary to carry out complementary analyses to understand the underlying mechanisms. We can also hypothesize that the higher amount of dissolved organic matter in the leachate in the NPs-TEs treatment (ESI Figure S6) is partly responsible for the increase in TEs content in the leachate when the soils were treated with NPs as TEs bound to OM (excepted for As which is few adsorb on OM and thus less leached) (Pédrot *et al.* 2008).

In addition, concerning the differences between treatments with and without plants, it seems that for overall the TEs except Pb, leaching of TEs decreased, varying from 36 % to 70 %, in the presence of sunflower compared to similar set-up without plants (**Figure 4**). Cover crop allowed to reduce TEs mobility and bioavailability (Bolan *et al.* 2011). Plants also affect pH and dissolved organic carbon leachates (ESI Figure S5) which in turn influences TEs mobility (Mounier *et al.* 2023).

Finally, it seems that nanomagnetites have few effects on TEs already present in the soil, as we have shown in previous work (Mounier *et al.* 2023). Indeed, we observed that the TEs present in the soil interact little with NPsMagn because they have already formed complexes with the soil constituents.

3.3. Effect of nanomagnetites on water stress under multimetal contamination

During the experiment, visual symptoms of water deficit were less pronounced at each water stress period for plants treated with the different nanomagnetites solutions. Thus, several analyses have been performed to further investigate this observation.

First, we examine leaf angle variation, which is an easily measurable indicator of water stress, between treatments and water stress periods. The evolution of the leaf angle according to field capacity (FC) or water deficiency (WD) periods shows that the plants of each treatment follow the same pattern except for those exposed to nanomagnetites plus TEs in the soil (**Figure 5A**). Thus, leaf angle of control plants decreases between 34 % to 50 % for WD periods compared to FC periods during the 60th and 87th days of culture. On the other hand, this decrease is significantly reduced for plants treated with nanomagnetites associated with TEs. Indeed, the angles respectively decrease among 11 % to 24 % and 11 % to 23 % between FC and WD periods for NPs-TEs and NPs@CA-TEs during the 60th and 87th days of culture (**Figure 5A**).

In addition, we also analyzed plants water content at harvest time (which corresponds to a WD period) but no significant differences were observed between treatments (Fig. 5B). Furthermore, no difference in proline content, which is known to be a water stress indicator, could be noted neither (ESI Figure S6) (Verbruggen & Hermans 2008). While phenotypic observations (visual symptoms of water deficiency assessed by leaves angle measurement) showed an effect of all treatments with nanomagnetites on the reduction of water stress symptoms, initial biochemical analyses did not.

Trace elements affect root hydraulic conductivity with consequent decreases in plant water content, turgor potential, and growth (Martínez-Fernández *et al.* 2011), but it is not known how metal nanoparticles (like IONPs) influence root water transport. As concluded by Bolan *et al.* (2014), further studies are needed with NPs at the root-soil interface, including measurements of plant water relations (plant water potential, osmotic potential, turgor potential, stomatal resistance, and transpiration rates). However, some studies have succeeded to demonstrated NPsMagn impact on (water) stress symptoms reduction (Khan *et al.* 2020; Mozafari *et al.* 2018; Semida *et al.* 2021). Enzymes of the antioxidative system could constitute new perspectives of studies. Indeed, Boaretto *et al.* (2014), observed that catalase enzymes seem to play a role under water stress conditions. In sugarcane drought-stress tolerant cultivar catalase enzyme shift in isoenzymes pattern compared to a commercial cultivar, which might have contributed to water stress tolerance. Additional investigations should also be necessary to characterize the implication of NPs in drought responsive-gene expression which begin to be studied (Kandhol *et al.* 2022). Nanomagnetite have also been reported to induced

modifications in amino acid content (Mounier *et al.* 2023). Change in amino acid content could reflect the induction of protective processes through activation of defensives gene (Chandra *et al.* 2015), synthesis of secondary metabolites which limit and repair damage to cells (Yoo *et al.* 2013), membrane protection (Sanità di Toppi & Gabbrielli 1999), reduced lipid peroxidation or enhanced TEs tolerance (Sanjaya *et al.* 2008). A hydroponic study on the root water transport of *H. annuus* exposed to nanomaghemite showed a reduction in hydraulic conductivity implying a lower water uptake by the plants, without detecting any change in their water relations (Martínez-Fernández *et al.* 2016). Other works suggested that nanomaterials such as multi-walled carbon nanotubes increased the expression of aquaporins in roots (Martinez-Ballesta & Carvajal 2014), or that ZnO or Mo NPs alter root morphology, which could alter water fluxes within the plant (Aubert *et al.* 2012; Lin & Xing 2008) . Finally, a third track to consider would be NPs effect on soil under water deficiency conditions. Mounier *et al.* (2023) measured the soil water potential and found it was four time superior in soil treated with NPsMagn (1 %). They hypothesis behind is that due to their high surface area, NPs could act clay. In soils, water adsorbs to the outer surfaces of clay particles at pore level and in the interfoliar spaces and thus increase soil water reserve.

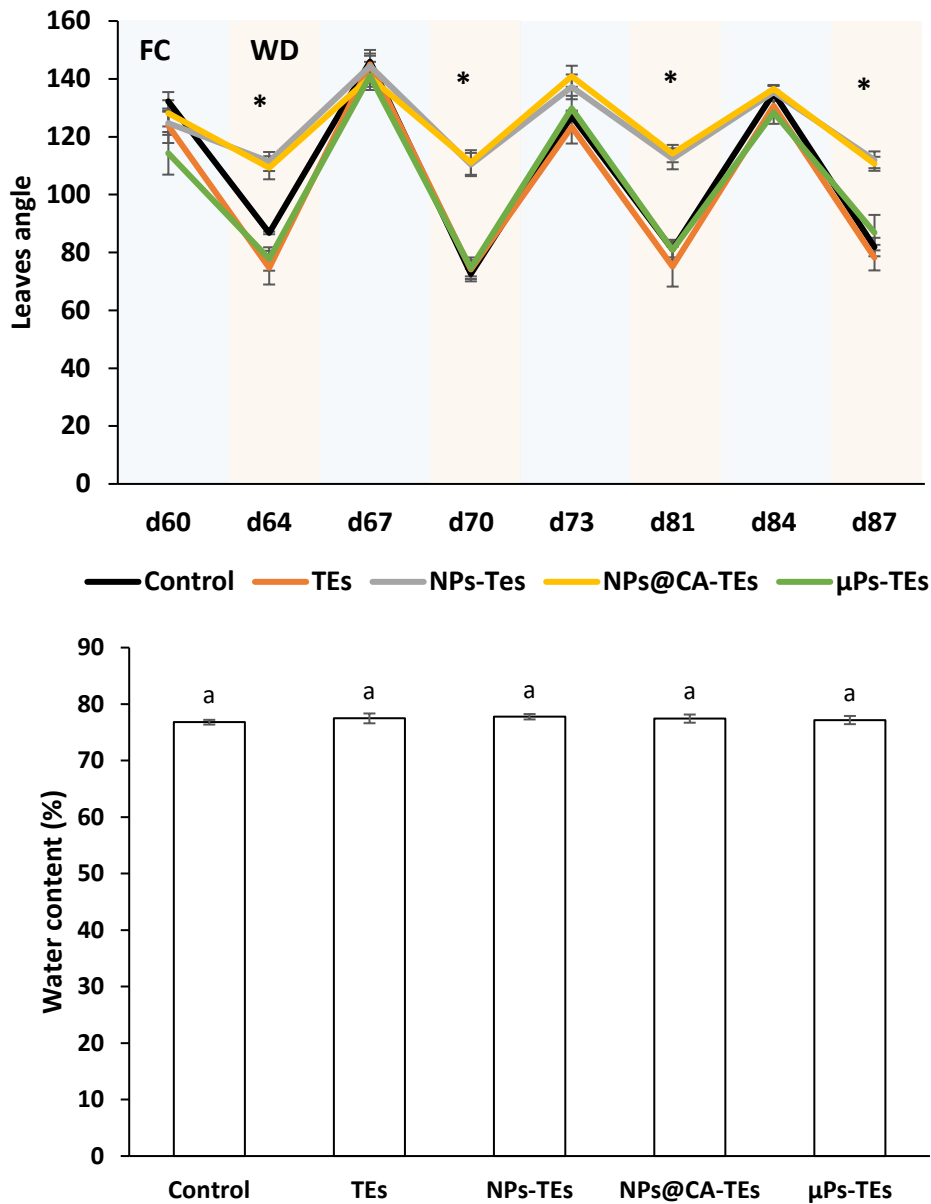


Figure 5 Stress water response measured during and after 90 days of growth in the different studied soils. (A) Leaves angles measured at different times of culture (FC = field capacity; WD = water deficiency). Measures correspond to the angle between the abaxial face of the leaf and the petiole. (B) Water content (%) measured in the aerial parts of sunflower plants after 90 days of growth. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$). An asterisk indicates significant difference with control ($p < 0.05$).

4. Conclusions

Growing concern has been raised about the potential adverse effects of pollutant mixtures in the environment, particularly soil pollutants. In this study, we investigated the phytotoxicity of a mixture of five trace elements among the most abundant in soils and particularly toxic for some, evaluating the adequacy of limit levels of TEs in sludge and in soils likely to receive sludge established in France ~~the French legal limits~~ for the protection of plants and the environment. Our results show that those limits established for an exposure to a single pollutant, seems also valid for an exposure to a mixture of different TEs. Furthermore, the addition of nanomagnetite in soil contaminated with TEs showed positive effects as (i) nanofertilizer as well as (ii) in nano(phyto)remediation. In this study, they are "environmental friendly" because the results show no toxicity to plants, an improved phytoremediation via increased extraction by plants for most of TEs, and improved resistance to water stress. The coating of magnetite NPs with citric acid was also tested to improve NPs stability, mobility and phytoextraction of TEs in the soil while reduce their phytotoxicity. However, compared to our initial hypothesis, citric acid does not bring any major added value to our study because the sorption capacity has not been improved. Finally, our work was also able to show a better response to water stress for plants treated with nanomagnetites under TEs stress. All those results bring new evidence that Fe_3O_4 NPs are biocompatible with plants and enhance phytoremediation. Another aspect to consider is that, under laboratory conditions using standard soils spiked with TEs, does not correctly represent the actual toxicity under field conditions, where the toxicity and bioavailability of TEs will be defined by the TE speciation, soil properties, aging processes, and the presence of multi-elemental pollution as well as the organisms studied. Thus, further studies are needed to evaluate the toxicity of a mixture of TEs under field conditions as well as for mixtures of different types of contaminants other than TEs only.

Author contributions

LM: conceptualization, methodology, validation, resources, formal analysis, investigation, data curation, writing – original draft, visualization. MBLC: methodology, validation, investigation. MP: conceptualization, methodology, validation, writing –review & editing,

supervision, funding acquisition. FCH: conceptualization, methodology, validation, writing – review & editing, supervision, funding acquisition, project administration.

Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the SURFNANO project funded by the CNRS-INSU EC2CO program and the SynFeSol project funded by the Brittany Region (AAP TRANSFERT 2019). Through the support of the GeOHeLiS analytical platform of Rennes University, this publication is also supported by the European Union through the European Regional Development Fund (FEDER), the French Region of Brittany and Rennes Metropole. We also thank THEMIS platform and Laura Fablet for their contribution to the TEM images acquisition, Phoomipat Jungcharoen for nanoparticles synthesis and characterization as well as Pierrick Roperch for magnetic susceptibility analyses. Léa Mounier was supported by a doctoral research grant from the University of Rennes 1–French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Al-Sid-Cheikh M., Pédrot M., Dia A., Davranche M., Jeanneau L., Petitjean P., Bouhnik-Le Coz M., Cormier M.-A., Grasset F. (2019) Trace element and organic matter mobility impacted by Fe₃O₄-nanoparticle surface coating within wetland soil. *Environmental Science: Nano* **6**:3049–3059.
- Ashagre H., Almaw D., Feyisa T. (2013) Effect of copper and zinc on seed germination, phytotoxicity, tolerance and seedling vigor of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cultivar Roma VF). *International Journal of Agricultural Science Research* **2**:312–317.
- Aubert T., Burel A., Esnault M.-A., Cordier S., Grasset F., Cabello-Hurtado F. (2012) Root uptake and phytotoxicity of nanosized molybdenum octahedral clusters. *Journal of Hazardous Materials* **219–220**:111–118.
- Azad Md.A.K., Islam Md.N., Alam A., Mahmud H., Islam M.A., Rezaul Karim M., Rahman M. (2009) Arsenic uptake and phytotoxicity of T-aman rice (*Oryza sativa* L.) grown in the As-amended soil of Bangladesh. *The Environmentalist* **29**:436–440.
- Baderna D., Lomazzi E., Pogliaghi A., Ciaccia G., Lodi M., Benfenati E. (2015) Acute phytotoxicity of seven metals alone and in mixture: Are Italian soil threshold concentrations suitable for plant protection? *Environmental Research* **140**:102–111.
- Balistrieri L., Mebane C. (2013) Predicting the toxicity of metal mixtures. *The Science of the total environment* **466-467C**:788–799.
- Bargar J.R., Brown G.E., Parks G.A. (1997) Surface complexation of Pb(II) at oxide-water interfaces: II. XAFS and bond-valence determination of mononuclear Pb(II) sorption products and surface functional groups on iron oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**:2639–2652.
- Bashir A., Rizwan M., Ali S., Zia ur Rehman M., Ishaque W., Atif Riaz M., Maqbool A. (2018) Effect of foliar-applied iron complexed with lysine on growth and cadmium (Cd) uptake in rice under Cd stress. *Environmental Science and Pollution Research* **25**:20691–20699.
- Bastani S., Hajiboland R., Khatamian M., Saket-Oskoui M. (2018) Nano iron (Fe) complex is an effective source of Fe for tobacco plants grown under low Fe supply. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **18**:524–541.
- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:21–34.
- Bhat J.A., Bhat M.A., Abdalmegeed D., Yu D., Chen J., Bajguz A., Ahmad A., Ahmad P. (2022) Newly-synthesized iron-oxide nanoparticles showed synergetic effect with citric acid for alleviating arsenic phytotoxicity in soybean. *Environmental Pollution* **295**:118693.
- Bilal Shakoor M., Ali S., Hameed A., Farid M., Hussain S., Yasmeen T., Najeeb U., Aslam Bharwana S., Hasan Abbasi G. (2014) Citric acid improves lead (pb) phytoextraction in

- Brassica napus* L. by mitigating pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **109**:38–47.
- Boaretto L.F., Carvalho G., Borgo L., Creste S., Landell M.G.A., Mazzafera P., Azevedo R.A. (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* **74**:165–175.
- Bolan N., Kunhikrishnan A., Thangarajan R., Kumpiene J., Park J., Makino T., Kirkham M.B., Scheckel K. (2014) Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials* **266**:141–166.
- Bolan N.S., Park J.H., Robinson B., Naidu R., Huh K.Y. (2011) Phytostabilization. *Advances in Agronomy*. Elsevier (eds), pp 145–204.
- Boonyapookana B., Parkpian P., Techapinyawat S., DeLaune R.D., Jugsujinda A. (2005) Phytoaccumulation of Lead by Sunflower (*Helianthus annuus*), Tobacco (*Nicotiana tabacum*), and Vetiver (*Vetiveria zizanioides*). *Journal of Environmental Science and Health* **40**:117–137.
- Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–254.
- Cakmak I., Marschner H. (1992) Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology* **98**:1222–1227.
- Calabrese E.J., Baldwin L.A. (2003) The Hormetic Dose-Response Model Is More Common than the Threshold Model in Toxicology. *Toxicological Sciences* **71**:246–250.
- Calabrese E.J., Mattson M.P. (2017) How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *Aging and Mechanisms of Disease* **3**:1–8.
- Cao Q., Hu Q.-H., Khan S., Wang Z.-J., Lin A.-J., Du X., Zhu Y.-G. (2007) Wheat phytotoxicity from arsenic and cadmium separately and together in solution culture and in a calcareous soil. *Journal of Hazardous Materials* **148**:377–382.
- Carignan J., Hild P., Meville G., Morel J., Yeghicheyan D. (2001) Routine Analyses of Trace Elements in Geological Samples using Flow Injection and Low Pressure On-Line Liquid Chromatography Coupled to ICP-MS: A Study of Geochemical Reference Materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. *Geostandards Newsletter* **25**:187–198.
- Chaignon V., Di Malta D., Hinsinger P. (2002) Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* **154**:121–130.
- Chandra S., Chakraborty N., Dasgupta A., Sarkar J., Panda K., Acharya K. (2015) Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific Reports* **5**:15195.

- Chen Q., Lu X., Guo X., Pan Y., Yu B., Tang Z., Guo Q. (2018) Differential responses to Cd stress induced by exogenous application of Cu, Zn or Ca in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **157**:266–275.
- Crea F., Foti C., Milea D., Sammartano S. (2016) Speciation of cadmium in the environment. Cadmium: from toxicology to essentiality., Sigel Astrid, Sigel Helmut, Sigel Roland K.O. A. Sigel, pp 63–83.
- Cullen W.R., Reimer K.J. (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* **89**:713–764.
- Dehner C.A., Awaya J.D., Maurice P.A., DuBois J.L. (2010) Roles of Siderophores, Oxalate, and Ascorbate in Mobilization of Iron from Hematite by the Aerobic Bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:2041–2048.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Davranche M., Cabello-Hurtado F. (2020) Surface modifications at the oxide/water interface: Implications for Cu binding, solution chemistry and chemical stability of iron oxide nanoparticles. *Environmental Pollution* **257**:113626.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-le-Coz M., Grasset F., Hanna K., Kamagate M., Cabello-Hurtado F. (2018) Colloidal and chemical stabilities of iron oxide nanoparticles in aqueous solutions: the interplay of structural, chemical and environmental drivers. *Environmental Science: Nano* **5**:992–1001.
- Demangeat E., Pédrot M., Dia A., Bouhnik-Le-Coz M., Roperch P., Compaoré G., Cabello-Hurtado F. (2021) Investigating the remediation potential of iron oxide nanoparticles in Cu-polluted soil–plant systems: coupled geochemical, geophysical and biological approaches. *Nanoscale Advances* **3**:2017–2029.
- Deng R., Lin D., Zhu L., Majumdar S., White J.C., Gardea-Torresdey J.L., Xing B. (2017) Nanoparticle interactions with co-existing contaminants: joint toxicity, bioaccumulation and risk. *Nanotoxicology* **11**:591–612.
- Dixit S., Hering J.G. (2003) Comparison of Arsenic(V) and Arsenic(III) Sorption onto Iron Oxide Minerals: Implications for Arsenic Mobility. *Environmental Science & Technology* **37**:4182–4189.
- Durenne B., Druart P., Blondel A., Fauconnier M.-L. (2018) How cadmium affects the fitness and the glucosinolate content of oilseed rape plantlets. *Environmental and Experimental Botany* **155**:185–194.
- El-Naggar A., Shaheen S.M., Ok Y.S., Rinklebe J. (2018) Biochar affects the dissolved and colloidal concentrations of Cd, Cu, Ni, and Zn and their phytoavailability and potential mobility in a mining soil under dynamic redox-conditions. *Science of The Total Environment* **624**:1059–1071.
- Fahad, Balouch A., Agheem M.H., Memon S.A., Baloch A.R., Tunio A., Abdullah, Pato A.H., Jagirani M.S., Panah P., Gabole A.A., Qasim S. (2020) Efficient mitigation of cadmium

- and lead toxicity in coriander plant utilizing magnetite (Fe₃O₄) nanofertilizer as growth regulator and antimicrobial agent. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **102**:1–12.
- Farid M., Ali S., Rizwan M., Ali Q., Abbas F., Bukhari S.A.H., Saeed R., Wu L. (2017) Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morpho-physiological and biochemical alterations in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**:90–102.
- Giannopolitis C.N., Ries S.K. (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* **59**:309–314.
- Hall J.L., Williams L.E. (2003) Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**:2601–2613.
- Hasan S.A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2009) Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* **30**:165–174.
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**:604–611.
- Hooda P. (2010) *Trace elements in soils*, Peter S. Hooda.
- Hou D., O'Connor D., Igalavithana A.D., Alessi D.S., Luo J., Tsang D.C.W., Sparks D.L., Yamauchi Y., Rinklebe J., Ok Y.S. (2020) Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment* **1**:366–381.
- Hu L., Zhang Z., Xiang Z., Yang Z. (2016) Exogenous Application of Citric Acid Ameliorates the Adverse Effect of Heat Stress in Tall Fescue (*Lolium arundinaceum*). *Frontiers in Plant Science* **7**:179.
- Hussain A., Ali S., Rizwan M., Rehman M.Z. ur, Qayyum M.F., Wang H., Rinklebe J. (2019) Responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants grown in a Cd contaminated soil to the application of iron oxide nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **173**:156–164.
- Iannone M.F., Groppa M.D., de Sousa M.E., Fernández van Raap M.B., Benavides M.P. (2016) Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* **131**:77–88.
- Iannone M.F., Groppa M.D., Zawoznik M.S., Coral D.F., Fernández van Raap M.B., Benavides M.P. (2021) Magnetite nanoparticles coated with citric acid are not phytotoxic and stimulate soybean and alfalfa growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **211**:111942.

- Ismael M.A., Elyamine A.M., Moussa M.G., Cai M., Zhao X., Hu C. (2019) Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* **11**:255–277.
- Jadhav S.H., Sarkar S.N., Ram G.C., Tripathi H.C. (2007) Immunosuppressive Effect of Subchronic Exposure to a Mixture of Eight Heavy Metals, Found as Groundwater Contaminants in Different Areas of India, Through Drinking Water in Male Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **53**:450–458.
- Järup L., Åkesson A. (2009) Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology* **238**:201–208.
- Jia L., Liu Z., Chen W., Ye Y., Yu S., He X. (2015) Hormesis Effects Induced by Cadmium on Growth and Photosynthetic Performance in a Hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Plant Growth Regulation* **34**:13–21.
- Journal Officiel République Française (1998) Arrêté du 3 juin 1998 modifiant l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. *Journal Officiel République Française*, 149: 9961-9962. [online] URL: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000206637/> (accessed 1 September 2021).
- Jungcharoen P., Pédrot M., Choueikani F., Pasturel M., Hanna K., Heberling F., Tesfa M., Marsac R. (2021) Probing the effects of redox conditions and dissolved Fe²⁺ on nanomagnetite stoichiometry by wet chemistry, XRD, XAS and XMCD. *Environmental Science: Nano* **8**:2098–2107.
- Kah M., Tufenkji N., White J.C. (2019) Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection. *Nature Nanotechnology* **14**:532–540.
- Kandhol N., Jain M., Tripathi D.K. (2022) Nanoparticles as potential hallmarks of drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* **174**:e13665.
- Karam F., Lahoud R., Masaad R., Kabalan R., Breidi J., Chalita C., Roupheal Y. (2007) Evapotranspiration, seed yield and water use efficiency of drip irrigated sunflower under full and deficit irrigation conditions. *Agricultural Water Management* **90**:213–223.
- Kermeur N., Pédrot M., Cabello-Hurtado F. (2023) Iron Availability and Homeostasis in Plants: A Review of Responses, Adaptive Mechanisms, and Signaling. Couée I (eds) *Plant Abiotic Stress Signaling*. Springer US, New York, NY, pp 49–81.
- Khan M.N., AlSolami M.A., Basahi R.A., Siddiqui M.H., Al-Huqail A.A., Abbas Z.K., Siddiqui Z.H., Ali H.M., Khan F. (2020) Nitric oxide is involved in nano-titanium dioxide-induced activation of antioxidant defense system and accumulation of osmolytes under water-deficit stress in *Vicia faba* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **190**:110152.

- Khan M.M., Islam E., Irem S., Akhtar K., Ashraf M.Y., Iqbal J., Liu D. (2018) Pb-induced phytotoxicity in para grass (*Brachiaria mutica*) and Castorbean (*Ricinus communis* L.): Antioxidant and ultrastructural studies. *Chemosphere* **200**:257–265.
- Komárek M., Vaněk A., Ettler V. (2013) Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – A review. *Environmental Pollution* **172**:9–22.
- Komjarova I., Blust R. (2009) Multimetal Interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn Uptake from Water in the Zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* **43**:7225–7229.
- Konate A., He X., Zhang Z., Ma Y., Zhang P., Alugongo G.M., Rui Y. (2017) Magnetic (Fe₃O₄) Nanoparticles Reduce Heavy Metals Uptake and Mitigate Their Toxicity in Wheat Seedling. *Sustainability* **9**:790.
- Latif A., Sheng D., Sun K., Si Y., Azeem M., Abbas A., Bilal M. (2020) Remediation of heavy metals polluted environment using Fe-based nanoparticles: Mechanisms, influencing factors, and environmental implications. *Environmental Pollution* **264**:114728.
- Lawre S., Raskar S. (2014) Influence of Zinc Oxide Nanoparticles on Growth, Flowering and Seed Productivity in Onion. *international journal of current microbiology and applied sciences* **3**:874–881.
- Li W., Khan M.A., Yamaguchi S., Kamiya Y. (2005) Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* **46**:45–50.
- Lin D., Xing B. (2008) Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **42**:5580–5585.
- Long X.X., Yang X.E., Ni W.Z., Ye Z.Q., He Z.L., Calvert D.V., Stoffella J.P. (2003) Assessing Zinc Thresholds for Phytotoxicity and Potential Dietary Toxicity in Selected Vegetable Crops. *Communications in soil science and plant analysis* **34**:1421–1434.
- López-Luna J., Silva-Silva M.J., Martínez-Vargas S., Mijangos-Ricardez O.F., González-Chávez M.C., Solís-Domínguez F.A., Cuevas-Díaz M.C. (2016) Magnetite nanoparticle (NP) uptake by wheat plants and its effect on cadmium and chromium toxicological behavior. *Science of The Total Environment* **565**:941–950.
- Manzoor N., Ahmed T., Noman M., Shahid M., Nazir M.M., Ali L., Alnusaire T.S., Li B., Schulz R., Wang G. (2021) Iron oxide nanoparticles ameliorated the cadmium and salinity stresses in wheat plants, facilitating photosynthetic pigments and restricting cadmium uptake. *Science of The Total Environment* **769**:145221.
- Martínez-Ballesta M. del C., Carvajal M. (2014) New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Science* **217–218**:71–77.
- Martínez-Fernández D., Barroso D., Komárek M. (2016) Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environmental Science and Pollution Research* **23**:1732–1741.

- Martínez-Fernández D., Walker D.J., Romero-Espinar P., Flores P., del Río J.A. (2011) Physiological responses of *Bituminaria bituminosa* to heavy metals. *Journal of Plant Physiology* **168**:2206–2211.
- Massart R. (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* **17**:1247–1248.
- Mimmo T., Del Buono D., Terzano R., Tomasi N., Vigani G., Crecchio C., Pinton R., Zocchi G., Cesco S. (2014) Rhizospheric organic compounds in the soil–microorganism–plant system: their role in iron availability. *European Journal of Soil Science* **65**:629–642.
- Moreno-Jiménez E., Esteban E., Carpena-Ruiz R.O., Peñalosa J.M. (2009) Arsenic- and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**:1781–1789.
- Mounier L., Pédrot M., Bouhnik-Le-Coz M., Cabello-Hurtado F. (2023) Impact of iron oxide nanoparticles on a lead-polluted water–soil–plant system under alternating periods of water stress. *Environmental Science: Advances* **2**:767–779.
- Mozafari A. akbar, Havas F., Ghaderi N. (2018) Application of iron nanoparticles and salicylic acid in in vitro culture of strawberries (*Fragaria × ananassa Duch.*) to cope with drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **132**:511–523.
- Muszyńska E., Hanus-Fajerska E., Ciarkowska K. (2018) Studies on lead and cadmium toxicity in *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype cultivated in vitro. *Plant Biology* **20**:474–482.
- Muszyńska E., Labudda M. (2019) Dual Role of Metallic Trace Elements in Stress Biology—From Negative to Beneficial Impact on Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:3117.
- Palmqvist N.G.M., Seisenbaeva G.A., Svedlindh P., Kessler V.G. (2017) Maghemite Nanoparticles Acts as Nanozymes, Improving Growth and Abiotic Stress Tolerance in *Brassica napus*. *Nanoscale Research Letters* **12**:631.
- Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., Sharma A. (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **52**:199–223.
- Pédrot M., Dia A., Davranche M., Bouhnik-Le Coz M., Henin O., Gruau G. (2008) Insights into colloid-mediated trace element release at the soil/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* **325**:187–197.
- Pérez-de-Luque A. (2017) Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture? *Frontiers in Environmental Science* **5**:12.

- Perl E.S. (2020) The limits of lead (Pb) phytoextraction and possibilities of phytostabilization in contaminated soil: a critical review. *International Journal of Phytoremediation* **22**:916–930.
- Poschenrieder C., Cabot C., Martos S., Gallego B., Barceló J. (2013) Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Science* **212**:15–25.
- Prato E., Scardicchio C., Biandolino F. (2008) Effects of temperature on the acute toxicity of cadmium to *Corophium Insidiosum*. *Environmental monitoring and assessment* **136**:161–6.
- Rahman S.U., Wang X., Shahzad M., Bashir O., Li Y., Cheng H. (2022) A review of the influence of nanoparticles on the physiological and biochemical attributes of plants with a focus on the absorption and translocation of toxic trace elements. *Environmental Pollution* **310**:119916.
- Rahmatizadeh R., Arvin S.M.J., Jamei R., Mozaffari H., Reza Nejhad F. (2019) Response of tomato plants to interaction effects of magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles and cadmium stress. *Journal of Plant Interactions* **14**:474–481.
- Rinklebe J., Shaheen S.M. (2014) Assessing the Mobilization of Cadmium, Lead, and Nickel Using a Seven-Step Sequential Extraction Technique in Contaminated Floodplain Soil Profiles Along the Central Elbe River, Germany | SpringerLink. *Water Air Soil Pollut* **225**:2039.
- Rizwan M., Ali S., Ali B., Adrees M., Arshad M., Hussain A., Zia ur Rehman M., Waris A.A. (2019) Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere* **214**:269–277.
- Rizwan M., Ali S., Rehman M.Z. ur, Riaz M., Adrees M., Hussain A., Zahir Z.A., Rinklebe J. (2021) Effects of nanoparticles on trace element uptake and toxicity in plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **221**:112437.
- Rizwan M., Ali S., Rizvi H., Rinklebe J., Tsang D.C.W., Meers E., Ok Y.S., Ishaque W. (2016) Phytomanagement of heavy metals in contaminated soils using sunflower: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **46**:1498–1528.
- Romero-Freire A., García Fernández I., Simón Torres M., Martínez Garzón F.J., Martín Peinado F.J. (2016) Long-term toxicity assessment of soils in a recovered area affected by a mining spill. *Environmental Pollution* **208**:553–561.
- Rout G., Das P. (2003) Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie* **23**:3–11.
- Rui M., Ma C., Hao Y., Guo J., Rui Y., Tang X., Zhao Q., Fan X., Zhang Z., Hou T., Zhu S. (2016) Iron Oxide Nanoparticles as a Potential Iron Fertilizer for Peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science* **7**:815.

- Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**:105–130.
- Sanjaya, Hsiao P.-Y., Su R.-C., Ko S.-S., Tong C.-G., Yang R.-Y., Chan M.-T. (2008) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase beta 1 (AtTSB1) in *Arabidopsis* and tomato confers tolerance to cadmium stress. *Plant, Cell & Environment* **31**:1074–1085.
- Santa-Cruz J., Vasenev I.I., Gaete H., Peñaloza P., Krutyakov Yu.A., Neaman A. (2021) Metal Ecotoxicity Studies with Artificially Contaminated versus Anthropogenically Contaminated Soils: Literature Review, Methodological Pitfalls and Research Priorities. *Russian Journal of Ecology* **52**:479–485.
- Semida W.M., Abdelkhalik A., Mohamed G.F., Abd El-Mageed T.A., Abd El-Mageed S.A., Rady M.M., Ali E.F. (2021) Foliar Application of Zinc Oxide Nanoparticles Promotes Drought Stress Tolerance in Eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plants* **10**:421.
- Siddhu G., Sirohi D.S., Kashyap K., Khan I.A., Khan M.A.A. (2008) Toxicity of cadmium on the growth and yield of *Solanum melongena* L. **29**:853–857.
- Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.K. (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**:405–412.
- de Sousa M.E., Fernández van Raap M.B., Rivas P.C., Mendoza Zélis P., Girardin P., Pasquevich G.A., Alessandrini J.L., Muraca D., Sánchez F.H. (2013) Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C* **117**:5436–5445.
- Tang J., Myers M., Bosnick K.A., Brus L.E. (2003) Magnetite Fe₃O₄ Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry* **107**:7501–7506.
- Tapia-Gatica J., Selles I., Bravo M.A., Tessini C., Barros-Parada W., Novoselov A., Neaman A. (2022) Global issues in setting legal limits on soil metal contamination: A case study of Chile. *Chemosphere* **290**:133404.
- Tombuloglu H., Slimani Y., Tombuloglu G., Almessiere M., Baykal A. (2019) Uptake and translocation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and its impact on photosynthetic genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chemosphere* **226**:110–122.
- Valentino-Álvarez J., Núñez-Nogueira G., Fernández-Bringas L. (2013) Acute Toxicity of Arsenic under Different Temperatures and Salinity Conditions on the White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biological trace element research* **152**
- Verbruggen N., Hermans C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**:753–759.

- Vikesland P.J., Heathcock A.M., Rebodos R.L., Makus K.E. (2007) Particle Size and Aggregation Effects on Magnetite Reactivity toward Carbon Tetrachloride. *Environmental Science & Technology* **41**:5277–5283.
- Vítková M., Puschenreiter M., Komárek M. (2018) Effect of nano zero-valent iron application on As, Cd, Pb, and Zn availability in the rhizosphere of metal(loid) contaminated soils. *Chemosphere* **200**:217–226.
- Webber J. (1981) Trace Metals in Agriculture. Lepp NW (eds) *Effect of Heavy Metal Pollution on Plants: Metals in the Environment*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 159–184.
- Wu X., Cobbina S.J., Mao G., Xu H., Zhang Z., Yang L. (2016) A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* **23**:8244–8259.
- Yan S., Wu F., Zhou S., Yang J., Tang X., Ye W. (2021) Zinc oxide nanoparticles alleviate the arsenic toxicity and decrease the accumulation of arsenic in rice (*Oryza sativa L.*). *BMC Plant Biology* **21**:150.
- Yoo H., Widhalm J.R., Qian Y., Maeda H., Cooper B.R., Jannasch A.S., Gonda I., Lewinsohn E., Rhodes D., Dudareva N. (2013) An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine:phenylpyruvate aminotransferase. *Nature Communications* **4**:2833.
- Yoon Y., Lee W.-M., An Y.-J. (2015) Phytotoxicity of arsenic compounds on crop plant seedlings. *Environmental Science and Pollution Research* **22**:11047–11056.
- Yruela I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:145–156.
- Zahedi S.M., Karimi M., Teixeira da Silva J.A. (2020) The use of nanotechnology to increase quality and yield of fruit crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**:25–31.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La phytoremédiation des sols pollués par des éléments traces apparaît comme une voie alternative, moins coûteuse, plus respectueuse des sols et de l'environnement, et plus acceptable pour la réhabilitation des sols, par rapport aux techniques physico-chimiques, lourdes et souvent destructives, qui sont employées à grande échelle pour traiter les sols pollués aux ETs. Malgré leurs atouts certains et leur intérêt grandissant dans le contexte de la protection des ressources en sols, les méthodes actuelles de phytoremédiation ne permettent généralement pas d'obtenir une dépollution satisfaisante du sol dans un temps raisonnable et souvent plusieurs dizaines d'années sont nécessaires pour ramener le sol à un seuil acceptable. Par ailleurs, ces méthodes sont peu appropriées au traitement des sols fortement contaminés avec une pollution de plusieurs ETs mélangés. Il existe donc aujourd'hui un besoin de nouvelles solutions de phytoremédiation, qui permettraient d'obtenir une dépollution satisfaisante, pour une large gamme d'ETs, et qui assureraient tout à la fois une gestion simplifiée des polluants, en association avec des coûts de fonctionnement acceptables et avec des temps de traitement raisonnables.

L'essor des nanotechnologies offre de nouvelles possibilités de remédiation de l'environnement pouvant fournir des solutions rentables à certains problèmes d'assainissement difficiles. Ainsi, l'utilisation synergique des nanomatériaux avec la phytoremédiation peut potentiellement augmenter l'efficacité de la décontamination par rapport à d'autre processus de phytoremédiation seuls. Les nanoparticules d'oxydes de fer présentent une affinité spécifique pour l'adsorption des ETs. Leur surface spécifique importante associée à une forte réactivité chimique de surface les rendent très prometteurs en tant qu'amendements efficaces et rentables pour l'assainissement des sols contaminés. Cependant, l'impact des NPs sur les plantes et l'environnement nécessite d'être évalué afin d'envisager des applications à plus grande échelle.

L'objectif de ce travail de thèse a consisté à étudier le devenir environnemental des nanoparticules de magnétite dans un système eau-sol-plante, ainsi que d'évaluer leur potentiel d'application en synergie à la phytoremédiation par le tournesol d'un ou plusieurs ETs dans le sol.

Le premier volet de cette thèse, centré sur l'étude à long terme de l'impact des nanomagnétites sur un système eau-sol-plante pollué par le plomb, nous a permis d'apporter des réponses concernant le comportement et devenir du Pb en présence de nanomagnétites ainsi que sur l'intérêt de l'association de nanomagnétites associés à la phytoremédiation à des fins de remédiation. Plus précisément, à des concentrations élevées comme celles recommandées pour la remédiation (1 % poids sol sec), si les nanomagnétites ont peu d'impact sur la croissance et sur certaines réponses physiologiques et biochimiques du tournesol, elles n'ont induit aucuns symptômes de toxicité chez les plantes étudiées. La teneur en Fe était supérieure dans les plantes traitées aux nanomagnétites ce qui suppose un effet nanofertilisant des NPs d'oxydes de fer via la libération de fer dissous dans la solution du sol. En outre, les plantes exposées aux nanomagnétites présentent une moindre peroxydation lipidique, une activité antioxydante et teneur en acides aminés totaux plus importants que les plantes non exposées, ce qui suggère un effet bénéfique des nanomagnétites dans un contexte de pollution au plomb. De plus, cette étude en sol montre que le sol affecte la mobilité des nanomagnétites dans le milieu et leur disponibilité aux plantes. Les mécanismes d'agrégation ainsi que les interactions avec certains constituants du sol (matière organique, argiles) pourraient diminuer la mise en contact des nanomagnétites avec les plantes. Toutefois, les mesures de susceptibilité magnétique réalisées nous permettent d'envisager que les nanomagnétites soient adsorbées sur les racines et puissent être absorbés dans les racines via les flux hydriques. Concernant l'aspect phytoremédiation, nous avons observé qu'à forte concentration de Pb dans le milieu (375 mg.kg^{-1}) le développement du tournesol n'est pas affecté. En revanche, les nanomagnétites améliorent la disponibilité et l'accumulation du Pb dans le tournesol puisque nos résultats montrent une plus grande quantité de Pb dans les parties aériennes lorsque le sol a été amendé en nanomagnétites. De même, les nanomagnétites améliorent la stabilité du Pb dans le sol (réduisant ainsi sa toxicité). En effet, les nanomagnétites ont permis de réduire le transfert du Pb et de matière organique dissoute dans les lessivas. Nous avons également pu observer que la présence de plantes affectait considérablement la quantité de Pb et MO lessivée dans la solution du sol.

La suite de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de la phytotoxicité d'un mélange de différents éléments traces fréquemment trouvés comme polluants dans les sols (As, Cd, Cu, Pb et Zn) en évaluant l'adéquation des limites légales françaises teneurs limites en ETs dans les sols susceptibles de recevoir des boues établies en France pour la protection des plantes et de l'environnement. Ainsi, aux concentrations limites de toxicité dans les sols pour chaque ET seul fixé par la législation française, le mélange n'a induit aucune phytotoxicité chez le tournesol. Une diminution de la taille des plantes, mais pas de la biomasse, ainsi que de l'activité de certaines enzymes antioxydantes ont toutefois été observées. Notre étude montre que ces limites semblent valables également pour les ETs en mélange. Par ailleurs, l'impact d'un amendement de nanomagnétites (1 % poids sol sec) sur ce mélange d'ETs dans l'objectif d'amélioration de la phytoremédiation a aussi été testé. Nous avons également essayé de maximiser les effets des nanomagnétites en limitant leur agrégation grâce à l'enrobage des nanomagnétites à l'acide citrique. En outre, les deux traitements aux nanomagnétites ont induit une augmentation de la production de biomasse végétale suggérant cette fois également l'effet nanofertilisant des nanomagnétites dans un contexte de multipollution aux ETs. L'activité des enzymes antioxydantes par rapport aux plantes non exposées a elle aussi été améliorée ; aidant ainsi les tournesols à mieux tolérer le stress. D'autre part, les effets des nanomagnétites sur la phytoremédiation des cinq ETs diffèrent selon les éléments. Ainsi, pour le Cd et Cu la phytoextraction est améliorée, pour le Pb et Zn les NPs sont peu impactantes, et enfin l'As est quant à lui immobilisé dans le sol après ajout de nanomagnétites limitant drastiquement sa bioaccumulation. L'étude des lessivas de solution du sol montrent que les nanomagnétites ont permis de mobiliser les ETs dans le sol (excepté pour l'As) sans pour autant augmenter l'ordre de grandeur de leur teneur dans l'eau. Une fois encore, nous avons pu constater que la présence de plante dans les systèmes de culture a une importance majeure pour la stabilisation des polluants dans les sols. Cependant, par rapport à notre hypothèse initiale, l'acide citrique n'apporte pas de valeur ajoutée majeure à notre étude car ni la phytoremédiation, ni la capacité de sorption des ETs n'a été améliorée.

Finalement, au cours de nos deux principales expérimentations, nous avons également souhaité tenter de caractériser par diverses méthodes l'impact des NPs de magnétite sur les plantes lors de périodes de stress hydrique. D'un point de vue physiologique, nous avons pu observer que les plantes cultivées dans un sol contaminé en ET en présence d'un amendement en nanomagnétites présentaient une meilleure réponse au stress hydrique ainsi qu'un

meilleur état hydrique des feuilles. En effet, la réduction de l'angle foliaire entre les périodes de capacité au champ et de stress est nettement améliorée en présence de nanomagnétites. Toutefois, nous n'avons pas réussi à quantifier ce phénomène de façon biochimique par le dosage de la teneur en proline, acide aminé marqueur du stress hydrique chez les plantes, qui n'a montré aucun changement. Cependant, des modifications de la teneur d'acide aminés totaux ont pu être constatés et peuvent constituer dans certains cas un indicateur de stress. Du point de vue du sol, nos résultats montrent que le potentiel hydrique du sol contaminé en Pb, lorsqu'il est amendé en nanomagnétites, est supérieur à ceux des sols non exposés, suggérant que l'eau est plus retenue dans le sol amendé en nanomagnétites.

Ces différents travaux apportent de nouvelles évidences quant aux bénéfices de l'association synergique des nanomagnétites avec la phytoremédiation pour les éléments traces, ainsi que leur biocompatibilité environnementale.

Les résultats suggèrent donc que l'association de NPs d'oxydes de fer et plantes de tournesol est une voie à développer pour améliorer la phytoremédiation des sols contaminés. Ayant constaté dans la littérature que les effets des NPs peuvent être très variables selon l'espèce végétale, il serait intéressant d'approfondir cette observation en étudiant le potentiel de nanoremédiation des nanomagnétites associées à d'autres espèces phytoremédiatrices et notamment des phytoaccumulatrices d'ETs dans un but d'amélioration constante de la phytoremédiation.

Le tournesol est une plante d'importance agroéconomique majeure, capable d'accumuler dans ses différents organes de multiples ETs. Une étude sur un cycle de vie complet de la plante, de la semence à la récolte de nouveaux grains, et sa descendance devra être envisagée pour examiner l'impact des nanomagnétites sur la production et la qualité des grains.

De plus, l'étude des ETs en mélange constitue aussi une piste à explorer. Un aspect à prendre en compte est que, dans des conditions de laboratoire les sols contaminés artificiellement avec des ETs, ne représentent pas correctement la toxicité réelle dans des conditions de terrain, où la toxicité et la biodisponibilité des ETs seront définies par les propriétés du sol et leur spéciation physique et chimique dans celui-ci, les processus de vieillissement, ainsi que les organismes étudiés. D'autres études sont donc nécessaires pour

évaluer la toxicité d'un mélange d'ETs dans des conditions de terrain ainsi que pour valider les effets des NPs d'oxydes de fer sur ces mélanges observés en laboratoire.

Afin d'envisager une utilisation pérenne des NPs d'oxydes de fer en nanoremédiation, il serait par ailleurs pertinent d'intégrer au système d'étude eau-sol-plante une dimension supplémentaire que sont la micro et macro faune du sol. Ainsi étudier l'impact des NPs dans un contexte de nanoremédiation sur les micro-organismes du sol ainsi que les invertébrés et petits mammifères constituerait un maillon ultime de réflexion pour notamment évaluer la question de leur écotoxicité et de leur pénétration potentielle dans la chaîne alimentaire.

Enfin, nos résultats ont permis de montrer une amélioration de la résistance au stress hydrique grâce à l'amendement du sol en nanomagnétites. Ces données préliminaires mériteraient d'être précisées et constituent des pistes de recherche prometteuses dans un contexte de réchauffement climatique, en particulier pour le secteur agricole, où le stress hydrique est l'une des principales causes de pertes de récoltes. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour d'une part caractériser l'impact des NPs sur la modification de la structure du sol et d'autre part clarifier quels sont les mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires sous-jacents. Est-ce que la morphologie et fonctionnement racinaire ainsi que l'efficacité de l'utilisation de l'eau sont affectés par les NPs ? Est-ce que la régulation de la conductance stomatique ou l'acquisition des nutriments sont modifiées ? En outre, des recherches approfondies au niveau moléculaire sont nécessaires pour améliorer la compréhension de la modulation de l'expression des gènes par les nanoparticules dans les situations de déficit hydrique. Cela permettra également d'envisager des applications nanobiotechnologiques afin d'accroître la tolérance des plantes au stress hydrique provoquée par une sécheresse.

ANNEXES

Annexe 1 : Supporting Information

Impact of iron oxide nanoparticles on a lead polluted water-soil-plant system under alternating periods of water stress

Léa Mounier^{a,b}, Mathieu Pédrot^b, Martine Bouhnik-Le-Coz^b, Francisco Cabello Hurtado^{a*}

^aUniv Rennes 1, CNRS, ECOBIO, UMR 6553, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

^bUniv Rennes 1, CNRS, Géosciences Rennes, UMR 6118, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

Environmental Science: Advances, 2023, **2**, 767 – 779

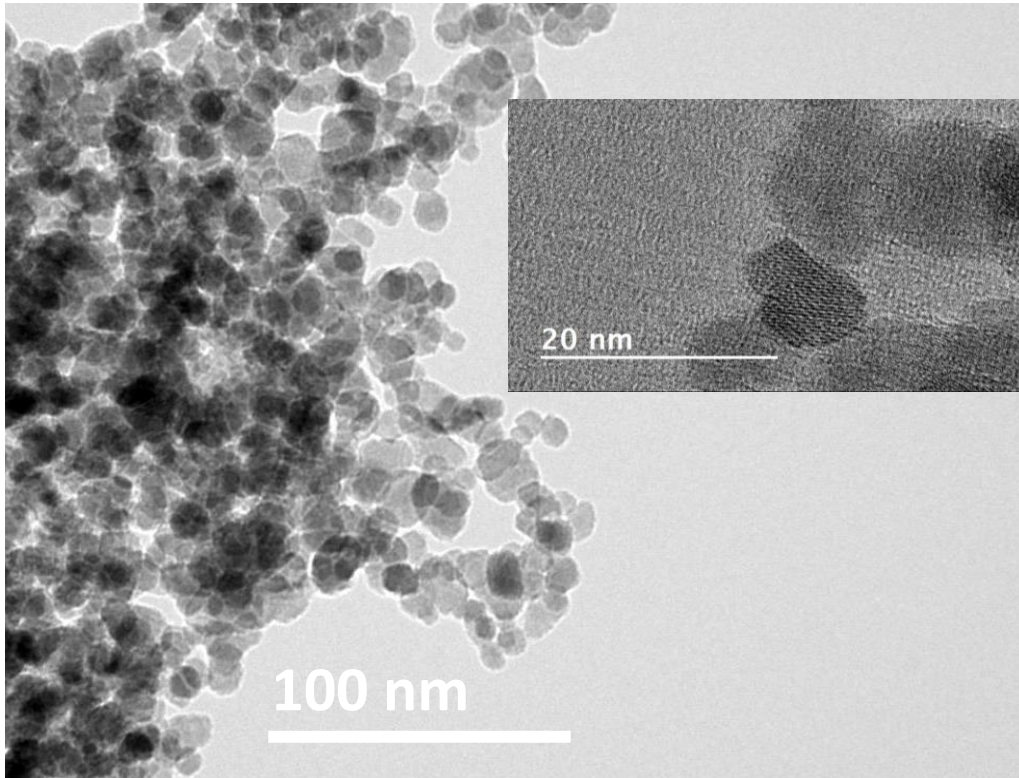


Figure S1 High resolution TEM observation of magnetite nanoparticles in aqueous suspension.

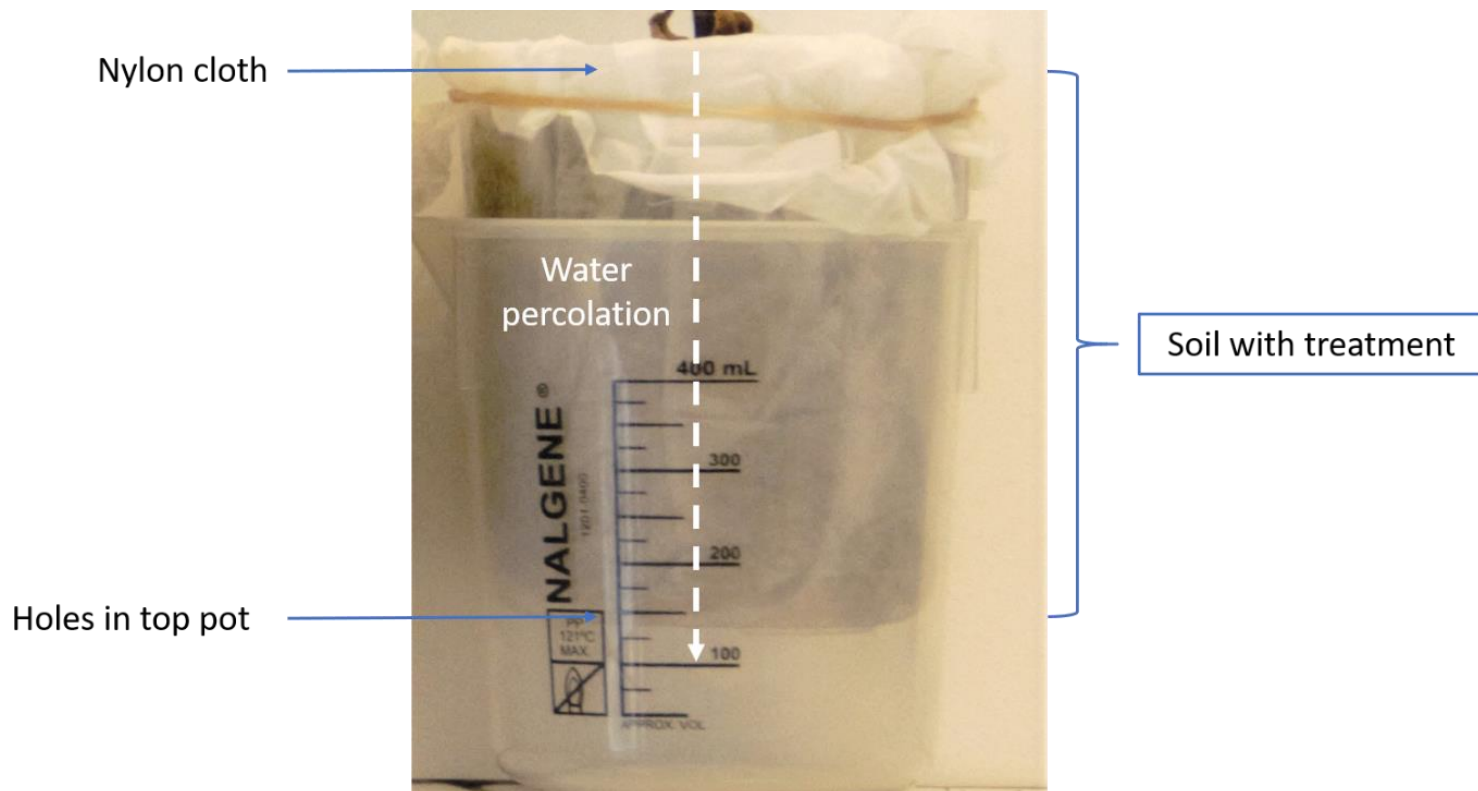


Figure S2 Experimental set-up of 400 mL polypropylene beaker (Nalgene).

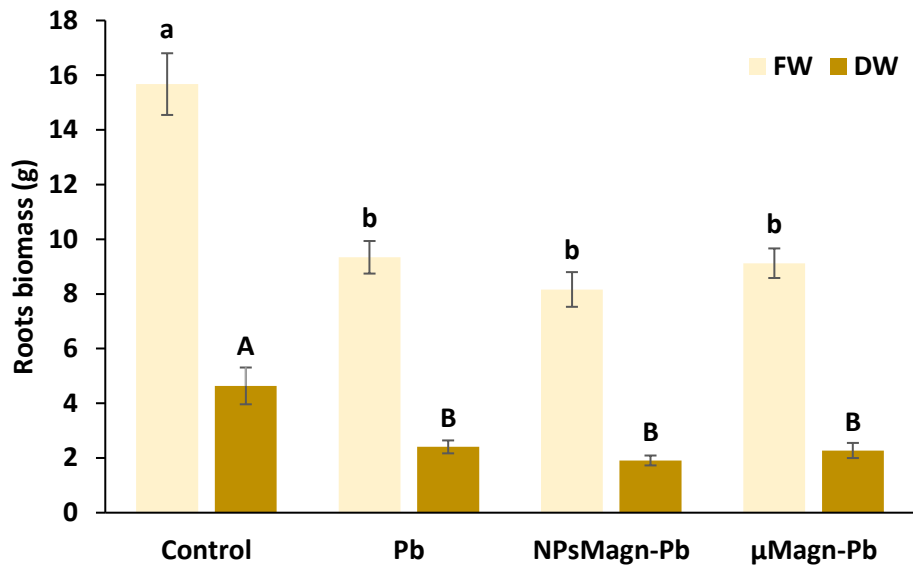


Figure S3 Fresh weight (FW) and Dry weight (DW) (g) of roots of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing Pb. NPsMagn-Pb or μ Magn-Pb. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters above indicates significant difference ($p < 0.05$).

Table S1 Soil elementary characterization. The analyses were performed in the SARM. Analytical laboratory (Vandoeuvre-lès-Nancy. France).

As (ppm)	Ba (ppm)	Be (ppm)	Bi (ppm)	Cd (ppm)	Co (ppm)
9.12	357	1.75	0.38	0.31	15.5
Cr (ppm)	Cs (ppm)	Cu (ppm)	Ga (ppm)	Ge (ppm)	Hf (ppm)
79.8	3.07	32.9	15.1	1.25	5.28
In (ppm)	Mo (ppm)	Nb (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)	Rb (ppm)
0.06	0.69	8.45	35.2	53.8	70.3
Sb (ppm)	Sc (ppm)	Sn (ppm)	Sr (ppm)	Ta (ppm)	Th (ppm)
1.70	12.50	4.17	44.6	0.78	6.19
U (ppm)	V (ppm)	W (ppm)	Y (ppm)	Zn (ppm)	Zr (ppm)
2.12	90.5	1.84	23.5	144	200
La (ppm)	Ce (ppm)	Pr (ppm)	Nd (ppm)	Sm (ppm)	Eu (ppm)
23.1	47.4	5.83	22.9	4.71	1.09
Gd (ppm)	Tb (ppm)	Dy (ppm)	Ho (ppm)	Er (ppm)	Tm (ppm)
4.15	0.671	4.21	0.886	2.41	0.358
Yb (ppm)	Lu (ppm)				
2.33	0.345				
SiO₂ %	Al₂O₃ %	Fe₂O₃ %	MnO %	MgO %	CaO %
64.24	11.59	5.90	0.076	1.16	0.41
Na₂O %	K₂O %	TiO₂ %	P₂O₅ %	PF %	Total %
0.53	1.95	0.81	0.21	12.88	99.75

Table S2 Quantum yield measured on the leaves between day 35 and 87 of the experiment. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

	Control	Pb	NPsMagn-Pb	μMagn
d35	0.85 \pm 0.007 a	0.85 \pm 0.003 a	0.85 \pm 0.001 a	0.85 \pm 0.004 a
d41	0.84 \pm 0.004 a	0.85 \pm 0.003 a	0.85 \pm 0.004 a	0.85 \pm 0.003 a
d48	0.83 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.007 a	0.82 \pm 0.007 a	0.84 \pm 0.006 a
d63	0.83 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.003 a
d66	0.83 \pm 0.007 a	0.84 \pm 0.004 a	0.83 \pm 0.006 a	0.84 \pm 0.004 a
d70	0.82 \pm 0.008 a	0.81 \pm 0.010 a	0.81 \pm 0.004 a	0.82 \pm 0.009 a
d77	0.82 \pm 0.003 a	0.82 \pm 0.006 a	0.82 \pm 0.006 a	0.82 \pm 0.008 a
d84	0.82 \pm 0.008 a	0.82 \pm 0.008 a	0.82 \pm 0.006 a	0.83 \pm 0.004 a
d87	0.82 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.004 a	0.83 \pm 0.005 a	0.83 \pm 0.003 a

Material and method: Maximum quantum yield of photosynthesis measurement.

Pulse-amplitude modulated (PAM) fluorescence was determined using a FluorPen FP100 on two leaves of each plant (n=6) after a dark adaptation for 30 min to oxidize the PSII reaction centers. Measurement were made at different days of growth (from day 35 to 87).

Annexe 2: Supporting Information

Effect of IONPs on multimetal contaminated soils and phytoextraction by sunflower

Léa Mounier^{a,b}, Mathieu Pédrot^b, Martine Bouhnik-Le-Coz^b, Francisco Cabello Hurtado^{a*}

^aUniv Rennes 1, CNRS, ECOBIO, UMR 6553, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

^bUniv Rennes 1, CNRS, Géosciences Rennes, UMR 6118, Av. General Leclerc, F-35042 Rennes Cedex, France.

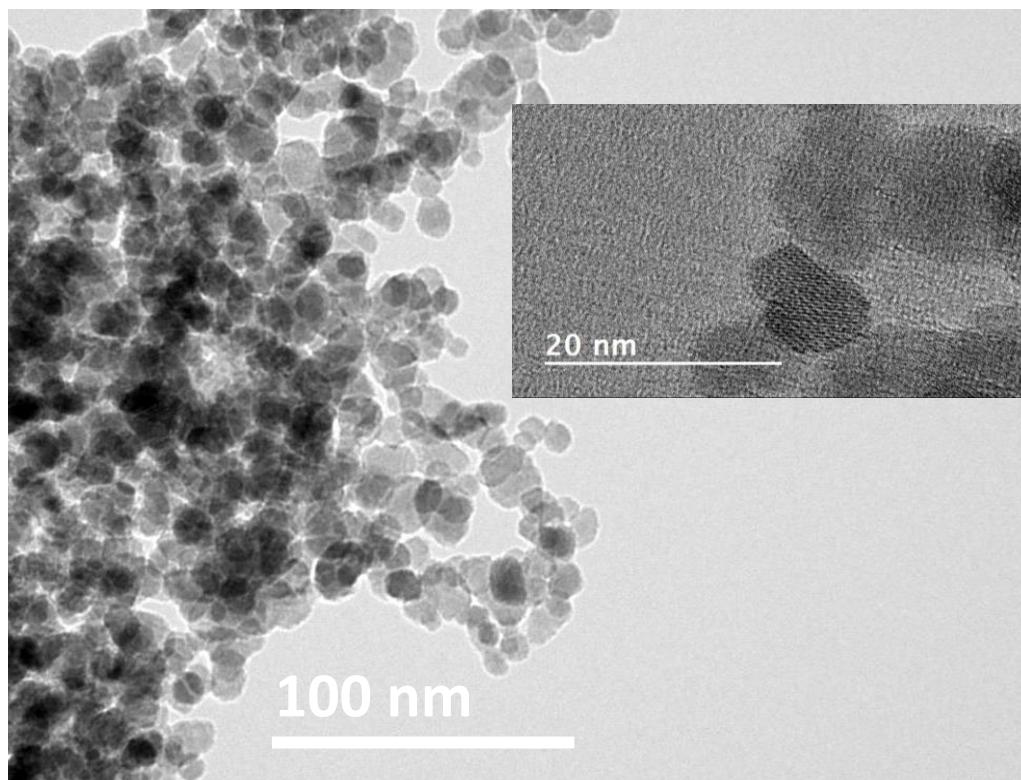


Figure S1 High resolution TEM observation of magnetite nanoparticles in aqueous suspension.

- ① Nylon cloth
- ② Holes in top pot
- ③ Water percolation
- ④ Soil with treatment

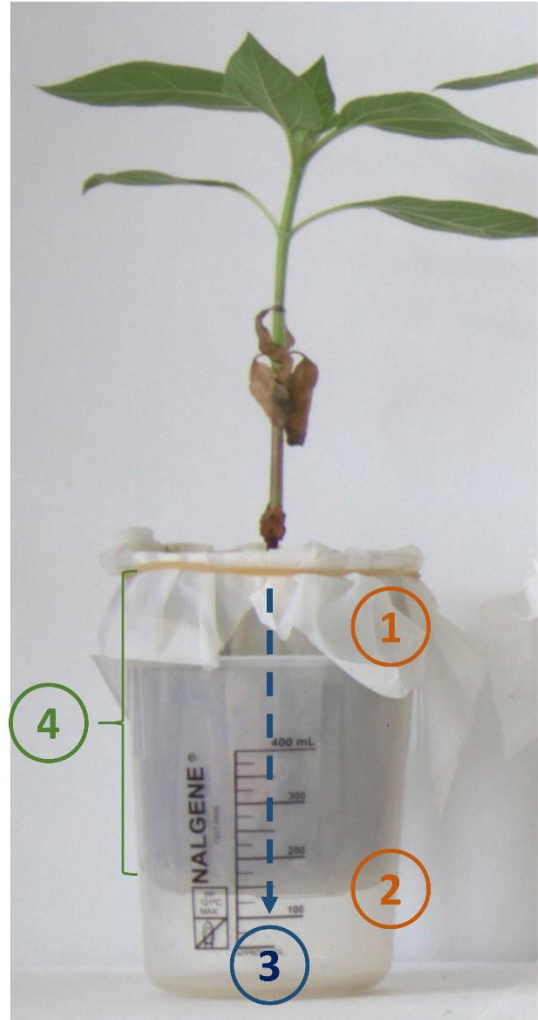


Figure S2 Experimental set-up of 400 mL polypropylene beaker (Nalgene).

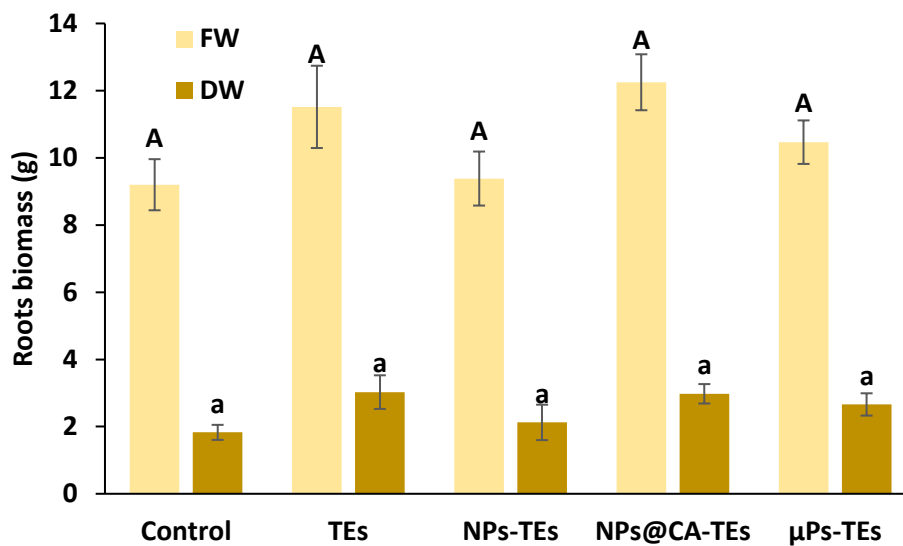


Figure S3 Fresh weight (FW) and Dry weight (DW) (g) of roots of sunflower plants measured after 90 days of growth on control soil or containing TEs, NPs-TEs, NPs@CA-TEs or μPs-TEs. Data represent the mean \pm SEM (n= 6). Different letters above indicates significant difference ($p < 0.05$).

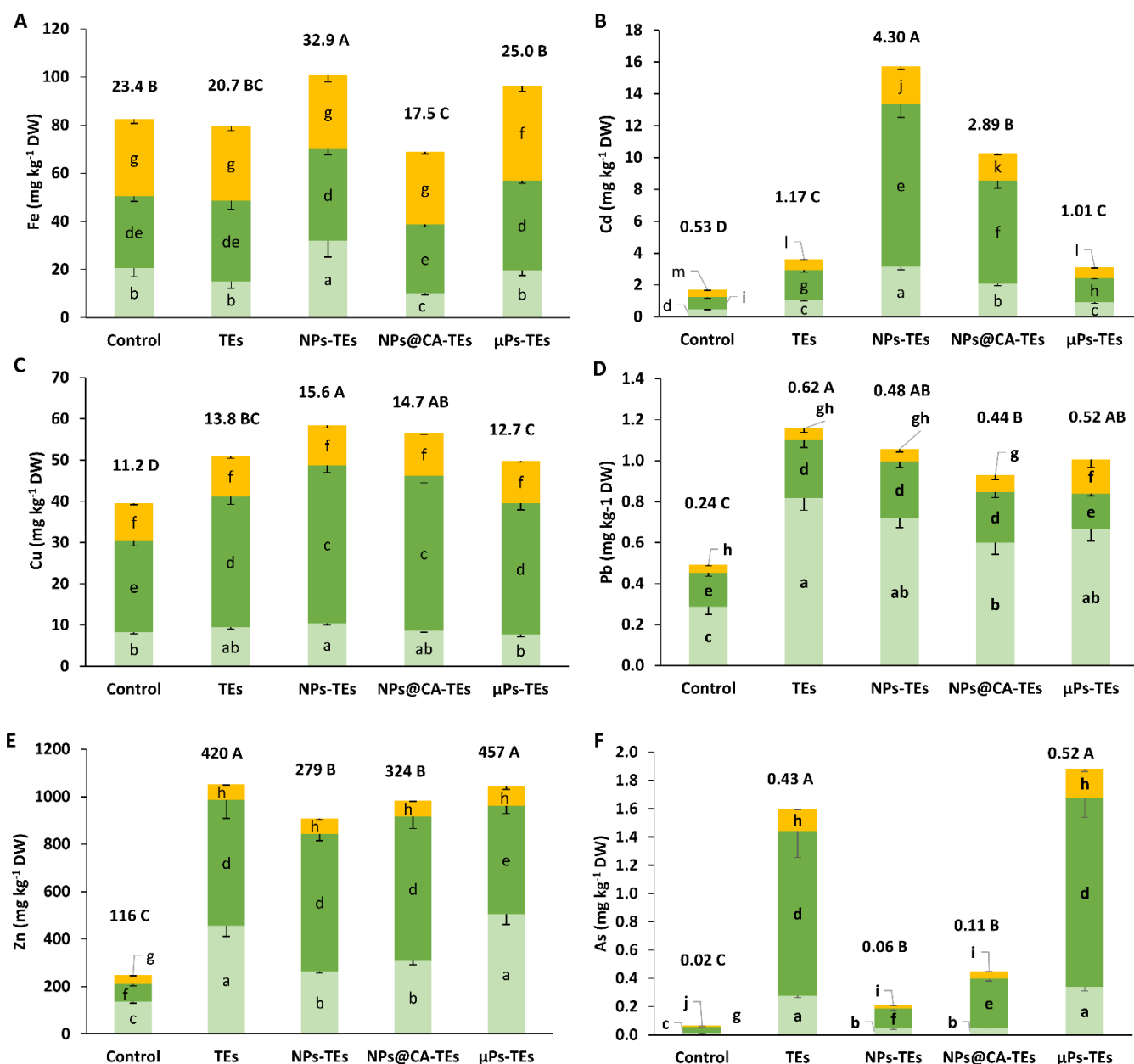


Figure S4 Iron and trace elements concentrations (mg kg⁻¹ DW) in stems (light green) leaves (green) and flower buds (yellow) measured by ICP-MS after 90 days of growth in the different studied soils. (A) Fe; (B) Cd; (C) Cu; (D) Pb; (E) Zn; and (F) As. Values above represent total concentration (mg kg⁻¹ DW) of iron or TEs in sunflowers. Data represent the mean ± SEM (n=6). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

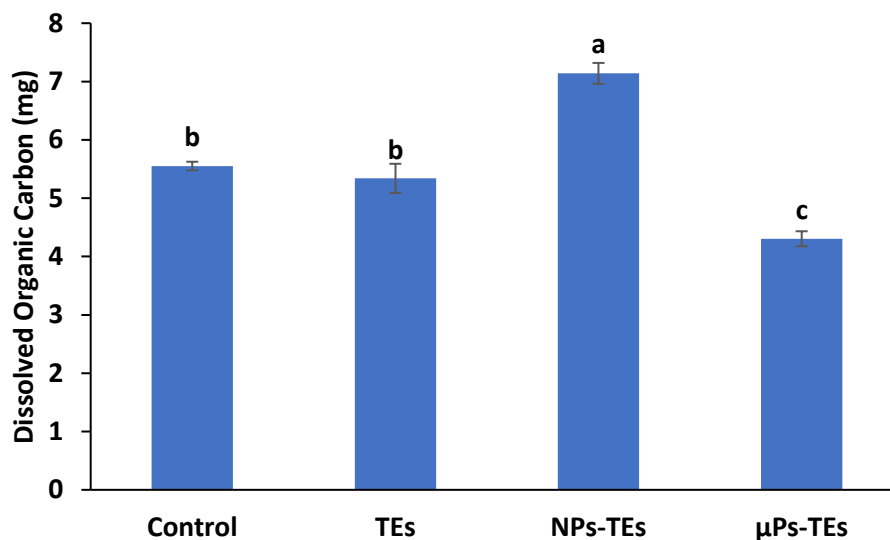


Figure S5 Total amount of dissolved organic carbon leached over the experiment (mg). Leachates were filtrated at 0.2 μ m with syringe filters to dissociate the particulate from the dissolved phase. Data represent the mean \pm SEM (n=3). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

Material and method: Dissolved Organic Carbon Determination.

Amount of dissolved organic carbon (DOC) was determined with a Total Organic Carbon Analyzer (TOC-L SHIMADZU). The accuracy of DOC measurement was estimated at \pm 3% (respectively by using standard solution of potassium hydrogen phthalate).

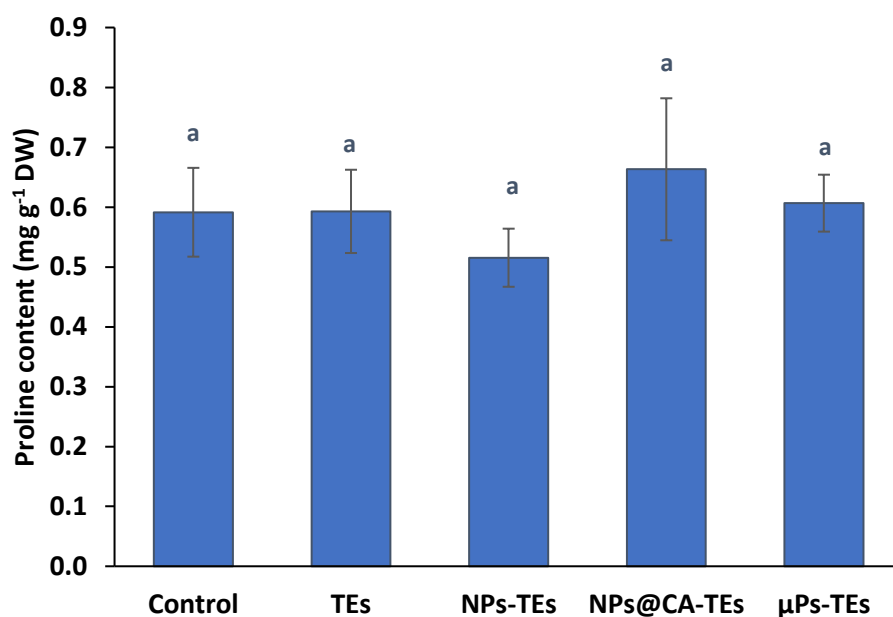


Figure S6 Proline content (mg g⁻¹ DW) measured in the leaves of sunflower plants after 90 days of growth. Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

Material and method: Proline Content Determination.

Determination of proline content was performed following Troll and Lindsley method. 100 μ L of amino acids extract were added with 1 mL of ninhydrin solution (6 mM ninhydrin, acetic acid (60 % v/v)) and heated at 95 °C for 20 min. Samples were cooled in water for 15 min, added with 3 mL of toluene and placed 1 h in the dark. After phase separation, the top solutions were slightly poured into a glass tank and absorbance was measured at 520 nm.

Table S1 Soil elementary characterization. The analyses were performed in the SARM. Analytical laboratory (Vandoeuvre-lès-Nancy, France).

As (ppm)	Ba (ppm)	Be (ppm)	Bi (ppm)	Cd (ppm)	Co (ppm)
9.12	357	1.75	0.38	0.31	15.5
Cr (ppm)	Cs (ppm)	Cu (ppm)	Ga (ppm)	Ge (ppm)	Hf (ppm)
79.8	3.07	32.9	15.1	1.25	5.28
In (ppm)	Mo (ppm)	Nb (ppm)	Ni (ppm)	Pb (ppm)	Rb (ppm)
0.06	0.69	8.45	35.2	53.8	70.3
Sb (ppm)	Sc (ppm)	Sn (ppm)	Sr (ppm)	Ta (ppm)	Th (ppm)
1.70	12.50	4.17	44.6	0.78	6.19
U (ppm)	V (ppm)	W (ppm)	Y (ppm)	Zn (ppm)	Zr (ppm)
2.12	90.5	1.84	23.5	144	200
La (ppm)	Ce (ppm)	Pr (ppm)	Nd (ppm)	Sm (ppm)	Eu (ppm)
23.1	47.4	5.83	22.9	4.71	1.09
Gd (ppm)	Tb (ppm)	Dy (ppm)	Ho (ppm)	Er (ppm)	Tm (ppm)
4.15	0.671	4.21	0.886	2.41	0.358
Yb (ppm)	Lu (ppm)				
2.33	0.345				
SiO₂ %	Al₂O₃ %	Fe₂O₃ %	MnO %	MgO %	CaO %
64.24	11.59	5.90	0.076	1.16	0.41
Na₂O %	K₂O %	TiO₂ %	P₂O₅ %	PF %	Total %
0.53	1.95	0.81	0.21	12.88	99.75

Table S2 Quantum yield measured on the leaves between day 60 and 83 of the experiment. Data represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

	Control	TEs	NPs-TEs	NPs@CA-TEs	μ Magn
d60	0.83 \pm 0.005 a	0.83 \pm 0.008 a	0.83 \pm 0.009 a	0.83 \pm 0.003 a	0.83 \pm 0.004 a
d83	0.80 \pm 0.018 a	0.79 \pm 0.023 a	0.82 \pm 0.012 a	0.83 \pm 0.003 a	0.81 \pm 0.013 a

Material and method: Maximum quantum yield of photosynthesis measurement.

Pulse-amplitude modulated (PAM) fluorescence was determined using a FluorPen FP100 on two leaves of each plant (n=6) after a dark adaptation for 30 min to oxidize the PSII reaction centers. Measurement were made at different days of growth (from day 60 to 83).

Titre : Évaluation du potentiel phytoremédiateur et stimulateur sur les plantes et du devenir environnemental des oxydes de fer nanoparticulaires.

Mots clés : phytoremédiation, nanoparticules d'oxyde de fer, éléments traces, adsorption, stress hydrique

Résumé : Depuis l'essor des nanoparticules d'oxydes de fer (NPs-OxFe), leur application a rapidement été étendue à la gestion environnementale car leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent une affinité spécifique pour l'adsorption des éléments traces. Dès lors, les recherches sur la nanoremédiation se sont accrues pour tenter d'améliorer les processus de phytoremédiation existants. La première partie de cette thèse étudie l'impact à long terme des NPs-OxFe sur une culture de tournesol dans un contexte de sol pollué par le plomb. Leur phytotoxicité, nanofertilisation, mobilité, ainsi que leur potentiel de nanoremédiation y sont examinés. Dans cette étude, nous montrons que les NPs-OxFe ne génèrent aucune phytotoxicité, réduisent le stress oxydatif et sont peu mobiles dans le sol. De plus, elles améliorent la phytoextraction du plomb tout en limitant le

lessivage de celui-ci vers la solution du sol. Dans un second temps, des travaux étudiant l'effet sur les plantes d'un cocktail d'éléments traces associés à l'application de NPs-OxFe sont menés. Le cocktail de contaminants n'induit pas de phytotoxicité. La réponse des plantes à l'exposition des NPs-OxFe se traduit par une augmentation de la biomasse végétale, une amélioration de la phytoextraction du cadmium et cuivre ainsi que de la réduction de l'accumulation de l'arsenic. L'ajout de NPs-OxFe enrobées à l'acide citrique induisent des effets similaires en toutes proportions à ceux des NPs-OxFe seules. À l'ensemble de ses résultats s'ajoute également une observation et quantification de l'amélioration de la tolérance au stress hydrique chez les plantes de tournesol traitées aux NPs-OxFe.

Title: Evaluation of the phytoremediation and stimulatory potential on plants and the environmental fate of iron oxide nanoparticles

Keywords: phytoremediation, iron oxide nanoparticles, trace elements, adsorption, water stress

Abstract: Since the development of iron oxide nanoparticles (IONPs), their application has been rapidly extended to environmental management due to their physicochemical properties which give them a specific affinity for trace elements adsorption. Since then, research on nanoremédiation has increased in an attempt to improve existing phytoremediation processes. The first part of this thesis studies the long-term impact of IONPs on a sunflower crop in a context of lead-polluted soil. Their phytotoxicity, nanofertilization, mobility and potential of nanoremédiation are examined. In this study, we show that IONPs do not generate phytotoxicity, reduce oxidative stress and have low mobility in soil. Moreover, they improve lead phytoextraction while limiting its

leaching into soil solution. In a second phase, work was carried out to study the effect on plants of a cocktail of trace elements associated with the application of IONPs. The cocktail of contaminants does not induce phytotoxicity. Plant response to IONPs exposure is reflected by increasing the plant biomass, improving cadmium and copper phytoextraction as well as reducing the accumulation of arsenic. The addition of IONPs coated with citric acid induces similar effects in all proportions to those of IONPs alone. In addition to all these results, we also observed and quantified the improvement of the tolerance to water stress in sunflower plants treated with IONPs.