



**HAL**  
open science

## **Intoxication oculaire au formaldéhyde**

Solène Bassi, Clément Boisseillier, Brivel Massamba, Françoise  
Brignole-Baudouin, Emmanuel Curis, Isabelle Kousignian

► **To cite this version:**

Solène Bassi, Clément Boisseillier, Brivel Massamba, Françoise Brignole-Baudouin, Emmanuel Curis, et al.. Intoxication oculaire au formaldéhyde. Acta discipulorum academiae medicamentariae artis, 2018, 2, pp.7-13. hal-01877093

**HAL Id: hal-01877093**

**<https://hal.science/hal-01877093>**

Submitted on 12 Oct 2018

**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.

# Intoxication oculaire au formaldéhyde

Étudiants : Solène BASSI, Clément BOISSEILLIER, Brivel MASSAMBA

Enseignants : Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN, Emmanuel CURIS, Isabelle KOUSIGNIAN

## Résumé

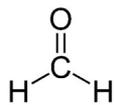
Le formaldéhyde est une molécule incolore, gazeuse à température ambiante et soluble dans l'eau. Il est produit par une réaction entre l'ozone et différents alcènes. Son utilisation très générale comme conservateur et antibactérien en fait un polluant majeur. Les cellules de l'œil et des tissus respiratoires sont en première ligne face à cette molécule. Des études concluantes ont déjà été réalisées sur l'atteinte du système respiratoire, c'est pourquoi nous cherchons à évaluer la toxicité du formaldéhyde pour les cellules de l'œil, notamment son implication dans le syndrome de l'œil sec. Pour évaluer cette toxicité, le système Vitrocell® a été utilisé. L'étude comporte 5 groupes, un groupe de cellules témoins cultivées à l'incubateur et immergées dans un liquide, le second groupe s'est vu retirer le liquide surnageant. Au troisième groupe a été ajouté un flux d'air sans formaldéhyde et les deux derniers groupes ont eu un flux d'air contenant du formaldéhyde à des concentrations de 100 µg/m<sup>3</sup> et 1200 µg/m<sup>3</sup>.

Nous avons étudié la production d'adénosine triphosphate (ATP) et de lactate déshydrogénase (LDH) de ces cellules afin d'évaluer leur viabilité dans les différentes conditions, ainsi que la production de différents facteurs de l'inflammation tels que l'interleukine 6 (IL-6), le facteur inhibant la migration des macrophages (MIF), la chimiokine de motif C-X-C et ligand 8 (CXCL8) et la chimiokine ligand 2 (CCL2). La stimulation de production de leur ARN est aussi étudiée. Au regard des résultats de ces expériences, le formaldéhyde n'a pas d'effet majeur sur la viabilité cellulaire, ni sur la production de cytokines inflammatoires qui semble surtout être influencée par le retrait du surnageant et l'ajout d'un flux d'air. Cependant, concentré à 1200 µg/m<sup>3</sup>, le formaldéhyde semble influencer la quantité des ARN des différentes cytokines étudiées. Il pourrait donc avoir une influence génique.

**Mots clés :** Formaldéhyde, cellules humaines de conjonctives, inflammation, Vitrocell®

## Introduction

Le formaldéhyde (HCOH, de formule développée indiquée ci-contre) est une molécule incolore, gazeuse à température ambiante, soluble dans l'eau. Il est produit par la réaction entre l'ozone et différents alcènes, tel que les terpènes. Cette molécule est utilisée comme conservateur et antibactérien dans différents domaines : elle est utilisée aussi bien pour la production de plastique, dans les peintures et revêtements de sol, dans les finitions de textiles, que comme produit de combustions. L'utilisation ubiquitaire du formaldéhyde en fait un polluant de l'air intérieur très important [1]. Ainsi, du fait de sa présence importante dans l'air, de nombreuses études ont été menées sur sa potentielle toxicité.



Le formaldéhyde est retrouvé à une concentration inférieure à 100 µg/m<sup>3</sup> dans la majorité des habitats américains et européens, cependant, dans les pays d'Asie, tel que la Chine et la Corée, sa concentration dans l'air intérieur des appartements avoisine les 100 µg/m<sup>3</sup>, et les dépasse même parfois [1]. Le formaldéhyde ne semble pas passer la barrière de l'épithélium et ses effets seraient donc limités à une toxicité directe touchant la surface des cellules épithéliales. Cependant, des expériences menées sur des rats et des souris ont pu mettre en évidence qu'un passage systémique du formaldéhyde pouvait avoir lieu, entraînant des effets indésirables [1]. Un effet irritant et pro-inflammatoire du formaldéhyde est principalement observé sur les cellules respiratoires ou les cellules oculaires. En effet, ce sont les deux muqueuses les plus exposées à l'environnement

extérieur, donc susceptibles d'être altérées par des polluants aériens [2].

Des études ont montré qu'une exposition longue et répétée au formaldéhyde entraîne une génotoxicité avec formation d'adduits à l'ADN pouvant s'accompagner d'effets clastogènes, notamment sur les cellules nasales, mais aussi sur différents types de cellules souches. Une relation causale et une relation dose-réponse significative ont été mises en évidence entre une exposition au formaldéhyde et des cancers du nasopharynx ou des leucémies [1, 3]. Il est intéressant d'étudier les cellules oculaires, car elles peuvent être une voie de passage vers la circulation systémique pour le formaldéhyde en cas d'irritation et d'inflammation.

La pollution de l'air intérieur ainsi qu'une faible humidité sont connues pour être impliquées dans le syndrome de l'œil sec. Physiologiquement, ce syndrome est caractérisé par une déstabilisation du film lacrymal précornéen, qui permet normalement de maintenir la surface externe de l'œil humide. De ce fait, l'épithélium cornéen devient plus sensible et plus exposé à l'environnement. Les symptômes sont des yeux irrités, brûlés et présentant des démangeaisons. Ils sont retrouvés notamment chez les individus travaillant de manière prolongée sur des écrans, clignant moins des yeux et donc ayant des yeux plus secs. Le syndrome de l'œil sec est exacerbé par différents facteurs de risque, comme la concentration importante en ozone, l'un des précurseurs du formaldéhyde. Cependant, le formaldéhyde ne provoque pas ce syndrome s'il n'est pas associé avec un autre facteur de risque aggravant la

déstabilisation du film lacrymal précornéen ou facilitant l'accès à l'épithélium cornéen [4].

La principale difficulté pour étudier les effets d'un gaz réside dans la réalisation d'un modèle représentant une exposition de cellules à un flux d'air, de la façon la plus réaliste possible. Pour cela, des modèles d'exposition cellulaire à interface air-liquide sont utilisés [5,6]. Cette approche permet de remplacer les animaux de laboratoire par des alternatives *in vitro* tout en se rapprochant le plus possible des expositions physiologiques. Pour notre expérience, nous avons utilisé un système Vitrocell®, considéré comme l'un des plus appropriés pour étudier l'impact des polluants aériens sur des cellules en permettant une exposition directe et dynamique à ces polluants. Son principe est rappelé dans la figure 1 ; il a une très grande sensibilité et permet d'éviter les réactions entre les gaz et le milieu de culture.

Pour observer des effets d'irritation, il est intéressant de doser la lactate déshydrogénase (LDH), qui permet de mettre en évidence l'intégrité membranaire, et l'adénosine triphosphate (ATP), qui traduit le métabolisme cellulaire [7]. Ensemble, ces paramètres permettent de renseigner sur la viabilité cellulaire. Pour évaluer l'inflammation, les concentrations de différents cytokines inflammatoires, telles que l'interleukine 6 (IL-6), le facteur inhibant la migration des macrophages (MIF), la chimiokine de motif C-X-C et ligand 8 (CXCL8) et la chimiokine ligand 2 (CCL2), sont mesurées. Ces cytokines sont libérées lorsque la cellule réagit à un stress ou à une agression. Enfin pour savoir si le formaldéhyde agit directement au niveau des gènes de ces cytokines, en les stimulant par exemple, les ARN de ces cytokines sont quantifiés [5,6].

L'objectif de cette étude est donc de mettre en évidence une modification de la viabilité cellulaire, de la concentration en cytokines pro-inflammatoires ou de l'ARN de ces cytokines lorsque les cellules oculaires sont directement exposées à du formaldéhyde.

## Matériels et Méthodes

### Culture cellulaire

#### Cellules utilisées

Les cellules utilisées sont des cellules humaines de conjonctives dérivées de cellules épithéliales de lignée WKD (*Wong-Kilbourne Derivative cells*), obtenues auprès de l'*American Type Culture Collection* (ATCC®). Elles sont cultivées en utilisant du milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) avec du milieu de culture Glutamax® supplémenté par 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) et 1 % de pénicilline et de streptomycine. L'incubation a été faite dans 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37 °C. Une fois à confluence, tous les 2 jours, les cellules sont décollées avec de la trypsine à 0,5 % dans du PBS

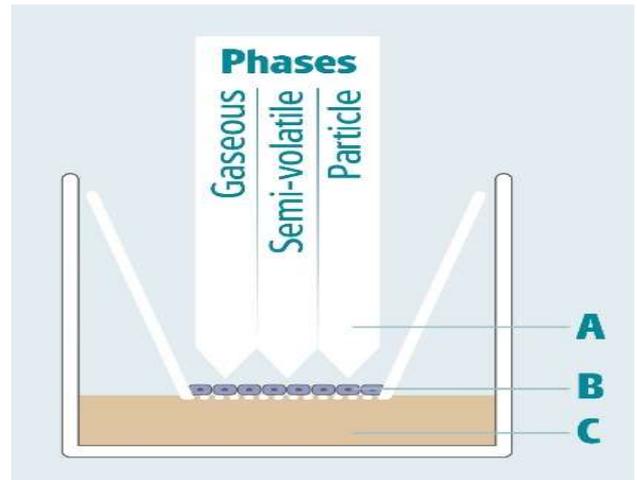


Figure 1 : Système Vitrocell® de culture cellulaire avec une interface air-liquide.

(A), atmosphère test, permettant d'exposer les cellules directement et de façon contrôlée à un milieu gazeux, semi-volatile ou particulaire. (B), cellules sur une membrane (C), milieu de culture sous les cellules.

(*Phosphate-buffered Saline*). Les cellules, une fois comptées, sont transférées dans des *inserts* (ThinCert™) pour l'expérimentation. Chaque *insert* contient 0,5 mL de cellules en suspension à une densité de  $1,5 \times 10^5$  cellules par mL. Après 24 h d'incubation, les *inserts* sont soumis à l'expérimentation.

#### Système d'exposition

L'atmosphère, générée avec une concentration en formaldéhyde de 100 ou 1200 µg/m<sup>3</sup>, est préparée selon la méthode décrite par Bardet et coll. en 2014 [4], technique communément utilisée dans le laboratoire de Santé publique et d'Environnement de la faculté de Pharmacie de Paris. Afin d'obtenir les concentrations

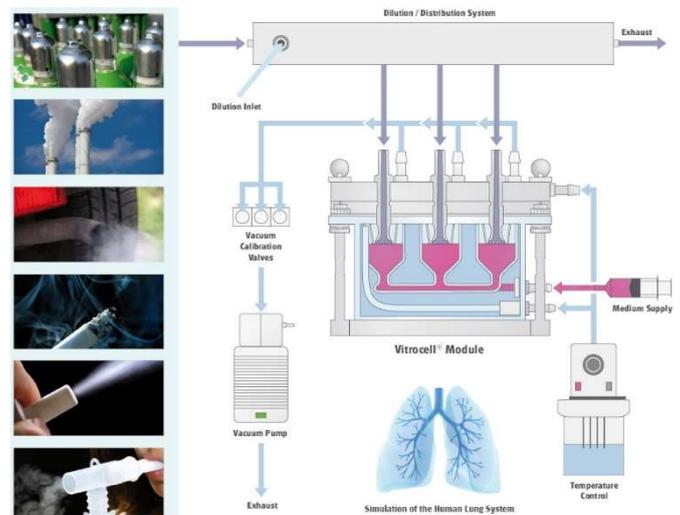


Figure 2 : principe de l'exposition à un flux d'air contenant du formaldéhyde à une concentration fixée.

gazeuses désirées, 5 µL d'une solution de formaldéhyde (solution F-1635, Sigma-Aldrich, France) sont vaporisées dans une chambre en verre de 4,5 L, précédemment vidée d'air puis remplie par un appareil avec de l'air contrôlé. Cet appareil délivre un flux de 4 L d'air par minute, à une température de 23 °C et avec une humidité relative de 20 %. L'atmosphère est stabilisée 15 min avant la première exposition. Cet appareil est relié à un système d'exposition dynamique à interface air-liquide Vitrocell® (figure 3), composé de trois chambres, chacune correspondant à un *insert* et une pompe située en aval permettant un flux d'air de 5 mL/min sur la face apicale des cellules déposées (interface air). L'embouchure est à 3 mm du bas de l'*insert*. Un bain à eau est connecté au système d'exposition pour maintenir les *inserts* à 37 °C. Les expériences menées ont été réalisées avec 3 modules Vitrocell®, correspondant à un total de 9 chambres pour chaque groupe, tout en tenant compte des durées d'exposition et de récupération adéquates. Par exemple, pour l'étude de la concentration en cytokines produites, on obtient 9 *inserts* par groupe ayant été exposé 15 min à leur condition et 9 *inserts* par groupe ayant été exposés 30 min à leur condition.

#### *Conditions d'exposition*

Cinq groupes de culture sont formés, auxquels des conditions d'expositions différentes sont appliquées :

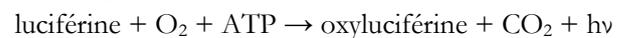
1. Une culture cellulaire contrôle, les cellules sont immergées avec une interface liquide-liquide, dans un incubateur classique (groupe INC).
2. Des cellules incubées à une interface air-liquide, sans flux d'air (groupe ASF).
3. Des cellules incubées à une interface air-liquide, avec un flux d'air sans formaldéhyde (groupe AF0).
4. Des cellules incubées à une interface air-liquide, avec un flux d'air contenant du formaldéhyde à une concentration de 100 µg/m<sup>3</sup> (groupe AF1).
5. Des cellules incubées à une interface air-liquide, avec un flux d'air contenant du formaldéhyde à une concentration de 1200 µg/m<sup>3</sup> (groupe AF2).

Les cellules en interface air-liquide sont préalablementensemencées sur une membrane, leur croissance est faite dans des conditions liquide-liquide. Une fois à confluence, l'*insert* est placé dans la chambre Vitrocell® après avoir retiré le milieu liquide de la face apicale de la culture. Les cellules sont ensuite exposées pendant 15 ou 30 min avant d'être remises dans l'incubateur en condition classique liquide-liquide dans le DMEM complété à 2,5 % de FBS afin de limiter leur prolifération, et ce durant une ou 24 h (temps de récupération). Juste avant l'exposition, le milieu de culture couvrant les cellules est collecté et centrifugé à 150 g pendant 5 min, puis les aliquots sont séparés en 2 échantillons. Ce surnageant est considéré comme la condition basale pour les essais de cytotoxicités et les dosages de cytokines.

#### *Conditions d'expérimentations*

##### *Viabilité cellulaire et métabolisme*

La viabilité cellulaire a pu être vérifiée grâce au CellTiter-Glo *Luminescent Cell Viability Assay Kit*, selon le protocole du fabricant (Promega, Madison, États-Unis). Ce test permet de quantifier l'ATP intracellulaire et donc la présence de cellules métaboliquement active. Après des temps de récupération d'une ou 24 h, le milieu de culture des cellules en *insert* est remplacé par 100 µL d'une solution réactive de CellTiter-Glo® et 100 µL de milieu cellulaire avec 2,5 % de FBS. Après 2 min dans une centrifugeuse pour promouvoir la lyse cellulaire, les cellules sont incubées à la température ambiante pendant 20 min afin de stabiliser le signal lumineux produit par la réaction entre la luciférine, le dioxygène et l'ATP, catalysée par la luciférase :



Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans une plaque de 96 puits noirs afin de mesurer le signal en utilisant le système VICTOR™ *X Light Luminescence Plate Reader* (PerkinElmer, Waltham, États-Unis). La viabilité cellulaire est exprimée en utilisant un rapport à partir des cellules à interface liquide-liquide (groupe INC). Les témoins négatifs sont exposés durant 15 ou 30 min et avec un temps de récupération d'une heure ou 24 h.

##### *Intégrité de la membrane cellulaire et cytotoxicité*

Après un temps de récupération d'une ou 24 h, tous les surnageants sont collectés, centrifugés pendant 5 min à 150 g et stockés à température ambiante. La mort cellulaire est évaluée en mesurant le relargage cytoplasmique en LDH des cellules abîmées à l'aide du Siemens Dimensions® *LDX Flex Reagent Cartridge*, selon les instructions du fabricant (Siemens, Erlangen, Allemagne). Ce test est exécuté à l'aide du système d'intégration chimique *Dimension® Xpand Plus*. En milieu tamponné à pH 9,4, la LDH, libérée dans le milieu cellulaire lorsque la membrane cellulaire est abîmée, oxyde en présence de NAD<sup>+</sup> le L-lactate pour obtenir du pyruvate et du NADH absorbant la lumière à 340 nm. Les résultats sont exprimés en rapport d'activité maximale de la LDH pour un total de cellules lysées. Cela correspond au rapport des concentrations de LDH présente dans le milieu extracellulaire, c'est-à-dire relargué de manière pathologique, par rapport à la concentration de LDH présente physiologiquement dans nos cellules. Ce rapport met en évidence la mort cellulaire. Ce résultat est ensuite converti en viabilité cellulaire relative. Les contrôles positifs et négatifs sont menés pour des temps d'exposition de 15 et 30 min et des temps de récupération d'une et 24 h.

##### *Isolement de l'ARN et réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétrotranscription (qRT-PCR)*

Après expérimentation et après une heure de récupération, une moitié des cultures cellulaires sont prélevées et rincées deux fois avec 600 µL de PBS. Par

la suite l'insert contenant la monocouche est prélevé et placé dans des tubes contenant 100  $\mu$ L d'un tampon de lyse RA1 (Mancherey Nagel, Düren, Allemagne) mis au vortex et stocké à  $-80$  °C. L'ARN total est extrait des cellules grâce au kit NucleoSpin® (Macherey Nagel). La réaction de transcription inverse est réalisée avec 400 ng d'ARN en utilisant un kit haute capacité (*cDNA reverse transcription kit*, Applied Biosystem, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les 5  $\mu$ L contenant l'ADN complémentaire sont alors amplifiés avec un Taqman® *Universal PCR Master Mix, no AmpErase®* UNG (Life technologies, Carlsbad, Californie, États-Unis), grâce à des amorces et des sondes venant de Taqman® *Gene Expression Assay* (Life Technologies) pour les cytokines IL-6, MIF, CXCL8 et CCL2.

Les niveaux d'expressions relatifs des gènes sont déterminés en utilisant la méthode  $\Delta\Delta$ Ct en utilisant comme gène de référence le gène *gapdh* (glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase). La méthode  $\Delta\Delta$ CT permet d'analyser les changements relatifs dans l'expression des gènes à partir des résultats d'une PCR. L'expression relative des ARNm d'IL-6, MIF, CXCL8 et CCL2 est établie par rapport au groupe de contrôles négatifs, cellules en milieu liquide-liquide (groupe INC). Les groupes de contrôle négatifs sont réalisés pour chacun des temps d'exposition de 15 ou 30 min.

#### Quantification des médiateurs pro-inflammatoires

Après exposition et 24 h de récupération, le surnageant de chaque culture cellulaire est collecté puis centrifugé pendant cinq minutes à 150 g et stocké à  $-80$  °C. Les cytokines IL-6, MIF, CXCL8 et CCL2 sécrétées par les cellules épithéliales sont quantifiées dans le surnageant en utilisant le kit ELISA DuoSet® ELISA *Development Systems* (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, États-Unis) selon les instructions du fabricant. L'absorbance est mesurée à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Infinite® M1000 PRO, Tecan, Männedorf, Suisse). Des courbes d'étalonnage sont utilisées pour calculer la concentration de cytokines, exprimées en pg/mL. Des contrôles négatifs ont été effectués pour chaque temps d'exposition de 15 ou 30 min.

#### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les tests statistiques utilisés sont choisis après avoir testé la normalité des variables quantitatives à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Si la variable ne suit pas une loi gaussienne, elle est analysée par un test non paramétrique de Wilcoxon. Sinon, un test paramétrique de Student est effectué après avoir vérifié l'égalité des variances. Les groupes exposés aux différentes conditions seront comparés entre eux, avec correction de multiplicité par la méthode de Bonferroni. Le test sera considéré significatif pour un seuil de 5 %.

## Résultats

### Viabilité cellulaire

Lors de notre expérience, aucune différence significative des indicateurs de viabilité n'a été observée entre les différents temps de récupération (1 h ou 24 h) par rapport au groupe INC (groupe n'ayant subi aucune condition particulière). Ainsi pour les analyses ultérieures, les données des deux temps de récupération ont été considérées simultanément, ce qui permet d'obtenir  $n = 6$  cultures par groupe.

Au contraire, la durée d'exposition influence la viabilité cellulaire. En effet, pour des durées d'exposition plus longues on peut observer une baisse de viabilité cellulaire (tableau 1 et figure 3), quelle que soit la mesure évaluant la viabilité cellulaire. Cela suggère que la durée d'exposition influence la viabilité cellulaire. Cependant, pour une même durée d'exposition, les indicateurs de viabilité ne diffèrent pas significativement d'un groupe à l'autre : l'ajout d'un flux d'air, avec ou sans formaldéhyde ne semble pas influencer la viabilité cellulaire.

Durée d'exposition	ATP		LDH	
	15 min	30 min	15 min	30 min
ASF	0,87 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,10	0,91 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,10
AF0	0,85 $\pm$ 0,18	0,74 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,04
AF1	0,81 $\pm$ 0,15	0,73 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,05
AF2	0,84 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,16	0,90 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,14

**Tableau 1 : Indicateurs de viabilité après différentes expositions.**

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart-type, relativement au groupe contrôle. ATP : quantification de l'ATP, indicateur de l'intensité du métabolisme cellulaire. LDH : quantification de l'activité de la LDH, indicateur de la viabilité relative cellulaire.  $n = 6$  expériences par condition.

### Marqueurs de l'inflammation

Le temps de récupération pour les cytokines est toujours de 24 h : avant ce délai les systèmes de défense n'ont pas le temps de les produire.

La durée d'exposition n'influence pas significativement la production des cytokines IL-6 et CCL2 (tableau 2, figures 4A et 4D). Cependant, elle influe sur la production des cytokines MIF et CXCL8, avec des concentrations moyennes entre 15 et 30 min significativement différentes (tableau 2, figures 4B et 4C). Un temps d'exposition long est associé à une augmentation de la production de MIF, alors qu'il est associé à une diminution de la production de CXCL8.

L'exposition aux différentes conditions ne semble influencer que la production de MIF. En effet, sa concentration augmente significativement lorsqu'on ajoute un flux d'air pendant 30 min par rapport au groupe contrôle, quel que soit groupe considéré, et par rapport au groupe sans surnageant et sans flux d'air. De

plus, la concentration en MIF semble diminuer lorsque les cellules sont exposées à 1200 µg/m<sup>3</sup> de formaldéhyde (figure 4B).

*ARN des cytokines inflammatoires*

Le temps de récupération pour les ARN est de 1 h, permettant de mettre en évidence une stimulation de la transcription. La durée d'exposition n'a pas significativement influencé la quantité des ARN des différentes cytokines. Les résultats ont donc été regroupés sans prendre en compte cette durée pour obtenir n = 6 cultures cellulaires par groupe.

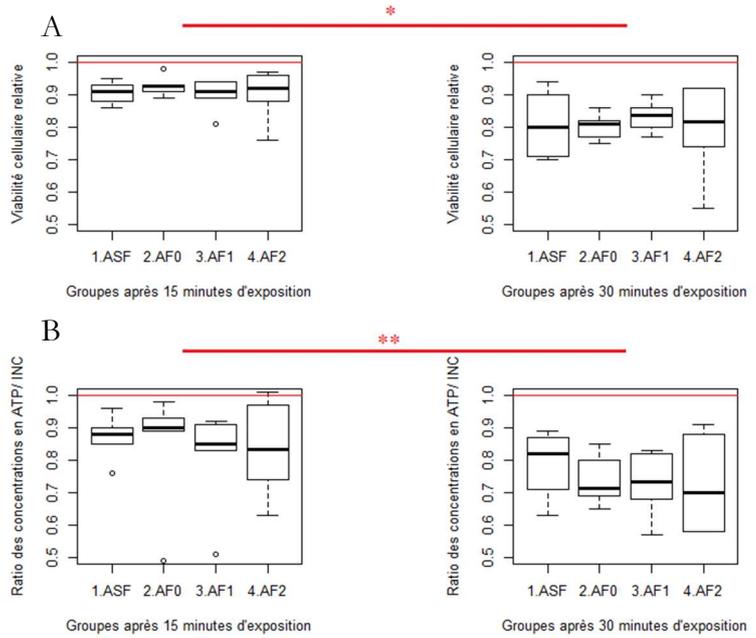
Il semble que l'ajout d'un flux d'air puis l'ajout de formaldéhyde dans l'air augmentent l'expression relative de l'IL-6 ; cependant, cette augmentation n'est pas significative (figure 5A). Une forte augmentation des quantités des ARNm de MIF et de CXCL8 est observée pour la culture cellulaire exposée à une forte concentration en formaldéhyde (groupe AF2, 1200 µg/m<sup>3</sup>), par rapport à toutes les autres conditions (figures 5B et 5C). La légère augmentation de quantité observée dans cette condition pour l'ARNm de CCL2 n'est, en revanche, pas significative (figure 5D).

**Discussion**

Les résultats analysés ne sont pas les résultats expérimentaux bruts, mais prétraités. Les données des 3 chambres d'un module Vitrocell® ont chaque fois été moyennées au préalable, ce qui rend les interprétations statistiques plus difficiles. De plus,

certaines valeurs isolées peuvent être dues à un problème de flux ou bien aux cellules mortes trop rapidement.

La présence de LDH est un signe de lyse cellulaire,



**Figure 3 : Indicateurs de viabilité cellulaire relative dans les différentes conditions et après 15 ou 30 min d'exposition.**

(A) : viabilité appréciée par l'activité de la LDH (B) viabilité appréciée par la concentration en ATP. Trait rouge : valeur moyenne dans le groupe contrôle. ASF : simple retrait du surnageant ; AF0 : retrait et l'ajout d'un flux d'air ; AF1 : flux d'air contenant 100 µg/m<sup>3</sup> de formaldéhyde ; AF2 : idem, mais avec 1200 µg/m<sup>3</sup>. \* : p < 0,05, \*\* : p < 0,01, tests de Student ou de Wilcoxon (n = 6).

**Tableau 2 : Concentrations des cytokines après 15 ou 30 min dans les différentes conditions**

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type, en pg/mL (n = 3)

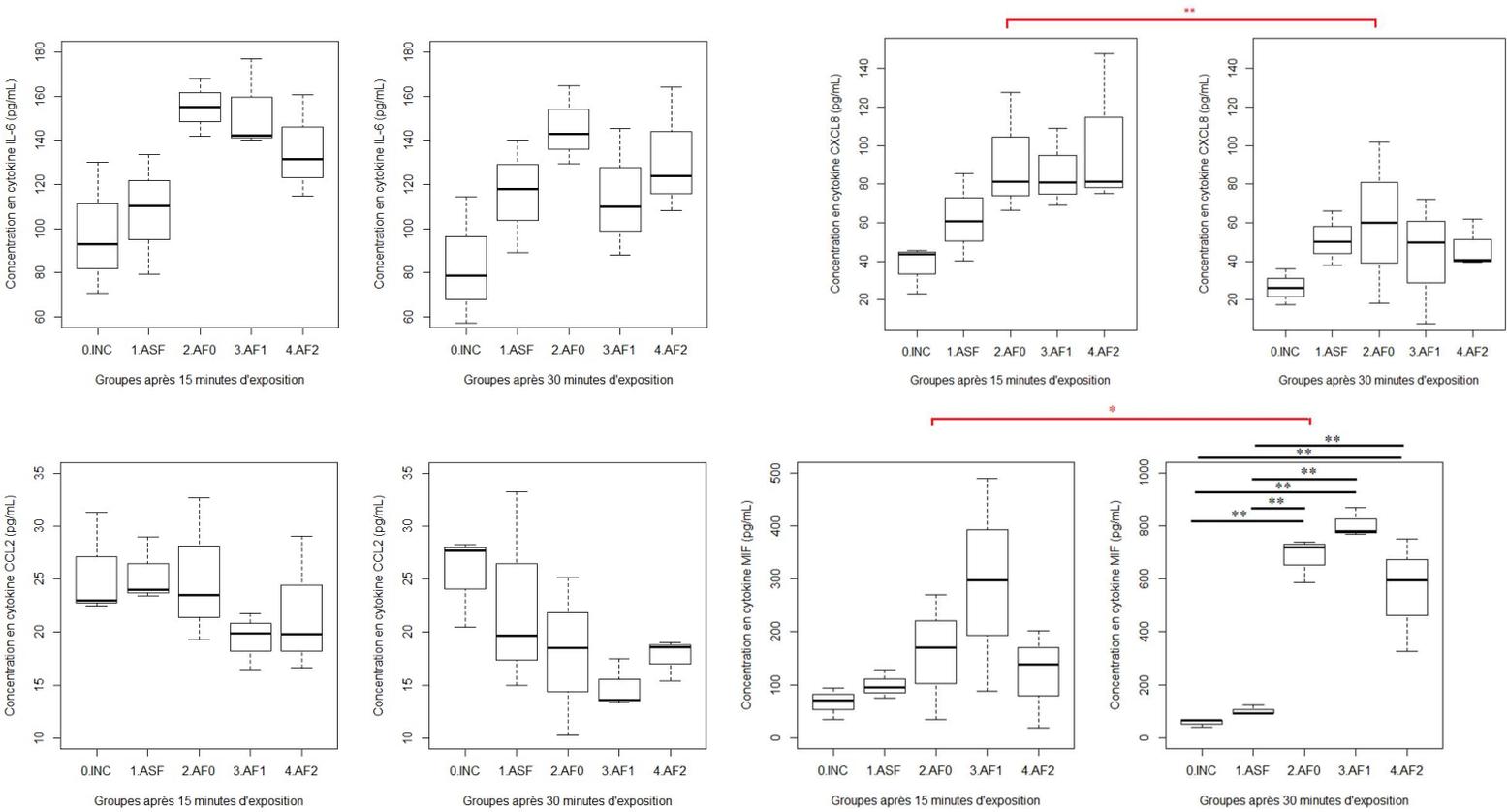
Durée d'exposition	IL-6		MIF		CXCL8		CCL2	
	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min
INC	97,8 ± 30,0	83,4 ± 28,9	66,5 ± 30,1	57,4 ± 15,5	37,5 ± 12,4	26,6 ± 9,3	25,6 ± 4,9	25,5 ± 4,3
ASF	107,7 ± 27,1	115,7 ± 25,6	98,8 ± 27,1	101,3 ± 18,2	62,2 ± 22,6	51,4 ± 14,1	25,5 ± 3,1	22,7 ± 9,5
AF0	155 ± 13,0	145,7 ± 18,0	158,2 ± 118,7	681,9 ± 84,4	91,9 ± 31,9	60,1 ± 41,8	25,2 ± 6,9	18,0 ± 7,5
AF1	153,1 ± 20,7	114,4 ± 29,0	291,8 ± 200,7	806,7 ± 55,3	86,3 ± 20,5	43,2 ± 32,7	19,4 ± 2,7	14,8 ± 2,3
AF2	135,5 ± 23,2	131,9 ± 28,8	119,7 ± 93,1	557,8 ± 214,4	101,5 ± 40,3	47,4 ± 12,7	21,8 ± 6,5	17,7 ± 1,9

**Tableau 3 : Quantités des ARNm des cytokines dans les différentes conditions**

Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type (n = 6), relativement au gène *gapdh* (gène de référence)

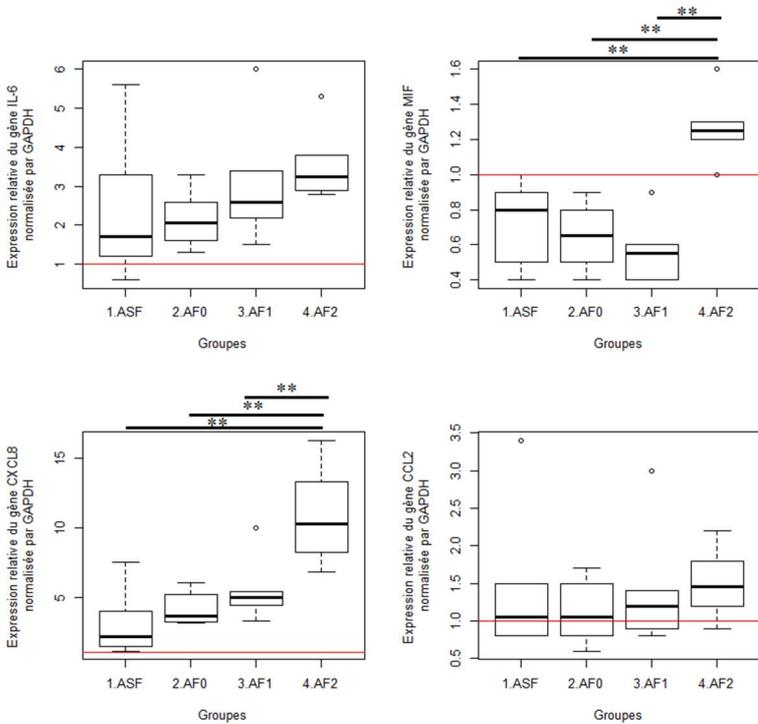
	IL-6	MIF	CXCL8	CCL2
ASF	2,35 ± 1,82	0,75 ± 0,24	3,05 ± 2,41	1,43 ± 1,00
AF0	2,15 ± 0,77	0,65 ± 0,19	4,13 ± 1,21	1,12 ± 0,42
AF1	3,05 ± 1,60	0,57 ± 0,19	5,50 ± 2,34	1,42 ± 0,81
AF2	3,55 ± 0,93	1,27 ± 0,20	10,85 ± 3,52	1,50 ± 0,50

ainsi son activité est augmentée lorsque la mort cellulaire est importante. En regardant l'inverse de son activité, c'est donc la viabilité cellulaire qui est mise en évidence. La LDH devient alors un marqueur de viabilité. Une diminution des concentrations en ATP traduit une diminution de l'activité métabolique cellulaire.



**Figure 4 (ci-dessus) : Concentration en cytokines IL-6 (A), MIF (B), CXCL8 (C) et CCL2 (D), après des durées d'exposition aux différentes conditions de 15 ou 30 minutes.**

INC : groupe contrôle ; ASF : simple retrait du surnageant ; AF0 : retrait et l'ajout d'un flux d'air ; AF1 : flux d'air contenant 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de formaldéhyde ; AF2 : idem, mais avec 1200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , tests de Student ou de Wilcoxon ( $n = 6$ ).



**Figure 5 (ci-contre) : Expression relative des gènes IL-6 (A), MIF (B), CXCL8 (C) et CCL2 (D), normalisée par un gène de référence (GAPDH)**

Trait rouge : valeur moyenne dans le groupe contrôle. ASF : simple retrait du surnageant ; AF0 : retrait et l'ajout d'un flux d'air ; AF1 : flux d'air contenant 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de formaldéhyde ; AF2 : idem, mais avec 1200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , tests de Student ou de Wilcoxon ( $n = 6$ ).

L'ensemble des données sur la LDH et l'ATP montre un effet sur la viabilité cellulaire dès le retrait du surnageant. En effet tous les groupes ont une viabilité significativement différente de 100 %. Ainsi, le retrait du surnageant suffit à influencer la viabilité de nos cellules conjonctives et les autres conditions appliquées à nos cellules ne corrigent pas cette viabilité diminuée. La durée d'exposition influence de manière significative la viabilité cellulaire. En effet, après 30 minutes d'exposition, les cultures cellulaires sont moins viables qu'après seulement 15 minutes. Dans des conditions physiologiques, le passage d'une interface liquide-liquide à une interface air-liquide n'a pas lieu, mais il peut être typique d'une condition pathologique. Par exemple, dans le syndrome de l'œil sec on observe une sécheresse oculaire, ce qui peut être traduit par l'apparition d'une

interface air-liquide, les cellules conjonctives n'étant plus protégées par le liquide lacrymal [4]. Les cellules ayant réagi au changement de milieu, cela pourrait avoir une répercussion sur la production de différentes cytokines inflammatoires et cela témoignerait d'un mécanisme de défense mis en jeu par les cellules et d'une inflammation de nos cellules conjonctives.

L'interleukine 6 (IL-6), cytokine inflammatoire, semble produite en plus grande quantité par l'ajout d'un flux d'air, bien que de façon non significative. Il pourrait donc exister une légère inflammation médiée par l'IL-6. Le retrait du surnageant et l'ajout d'un flux d'air sont des paramètres du syndrome des yeux secs. Mais l'ajout de formaldéhyde ne semble pas modifier le mécanisme de l'inflammation médiée par IL-6. La mise en contact des cellules avec le flux d'air entraîne un stress cellulaire et donc une augmentation de la production des cytokines, dont MIF. Cette dernière exacerbe les mécanismes de l'inflammation en favorisant la mobilisation d'autres cellules inflammatoires telles que les macrophages et les polynucléaires qui à leur tour vont sécréter des facteurs inflammatoires. Ceci est cohérent avec l'augmentation de MIF au cours du temps. L'hypothèse émise est que des concentrations anormalement élevées de MIF pourraient être un facteur déterminant dans la mort de nos cellules conjonctives. La tendance de MIF à diminuer après une exposition à 1200 µg/m<sup>3</sup> de formaldéhyde, par rapport à l'exposition à 100 µg/m<sup>3</sup>, peut s'expliquer par une mort cellulaire induite de nos cellules, qui ne peuvent alors plus produire de cytokines. Cette tendance peut aussi s'expliquer par le phénomène d'hormèse ou adaptation des cellules à leur nouvel environnement. Ces phénomènes peuvent aussi expliquer la diminution de la cytokine CXCL8 après 30 minutes dans les différentes conditions. Cette diminution a déjà été décrite sur des cellules nasales exposées au formaldéhyde [5]. L'ensemble de ces données suggère que le retrait du surnageant aurait un rôle déterminant dans l'induction de l'inflammation des

cellules conjonctives, alors que le formaldéhyde ne semble pas exacerber la concentration en cytokines inflammatoires dans ces expériences.

Vérifier le taux d'ARN est intéressant pour observer une éventuelle action du formaldéhyde au niveau de l'expression des gènes. Le formaldéhyde à forte concentration, 1200 µg/m<sup>3</sup>, augmente la concentration en ARN codant pour MIF et CXCL8, tendance retrouvée pour les ARN codant pour IL-6 et CCL2. Le formaldéhyde agirait donc, à forte dose, sur l'expression des gènes de ces cytokines, mais ces observations ne se retrouvent pas tout à fait au niveau de la production des cytokines.

La présence de formaldéhyde ne semble donc pas agir sur la viabilité et la production de cytokines inflammatoires des cellules de conjonctives, pour des temps courts. Les résultats orientent plutôt vers une influence du changement de milieu. D'autre part, ces expériences incitent à explorer le rôle des cytokines IL-6, MIF et CXCL8 dans l'évolution des pathologies oculaires. En effet, il serait intéressant d'inactiver la production de ces cytokines et d'étudier leur implication dans le syndrome des yeux secs. Toutefois, le formaldéhyde semble agir au niveau génique lorsque les cellules conjonctives sont directement exposées à l'environnement, c'est-à-dire lorsque le film lacrymal précornéen est déstabilisé, dans le syndrome de l'œil sec par exemple. Il faut donc continuer à surveiller la concentration en formaldéhyde des habitations. D'autres études pourraient aussi être mises en place pour savoir comment le formaldéhyde agit sur l'expression. Enfin, dans l'environnement, les cellules oculaires sont exposées à des doses de formaldéhyde moindres, mais cette exposition dure plus de 30 minutes notamment dans les habitations, il serait donc intéressant de réaliser cette étude sur des périodes d'exposition plus longues pour confirmer que la durée impacte la viabilité cellulaire et l'inflammation.

## Bibliographie

- [1] G. D. Nielsen, S. T. Larsen & P. Wolkoff, « Re-evaluation of the WHO (2010) formaldehyde indoor air quality guideline for cancer risk assessment », *Archive of Toxicology*, mai 2016, vol. 91 n° 1, p. 35-61.
- [2] J. Jude, C. Koziol-White, J. Scala, E. Yoo, W. Jester, C. Maute, P. Dalton & R. Panettieri Jr, « Formaldehyde Induces Rho-Associated Kinase Activity to Evoke Airway Hyperresponsiveness », *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, octobre 2016, vol. 55 n° 4, p. 542-553.
- [3] S.C. Kwon, I. Kim, J. Song & J. Park, « Does formaldehyde have a causal association with nasopharyngeal cancer and leukaemia? », *Annals of occupational and environmental medicine*, janvier 2018, vol. 30 n° 5, p. 1-13.
- [4] P. Wolkoff, « External eye symptoms in indoor environment », *Indoor Air*, mars 2017, vol. 27 n° 2, p. 246-260.
- [5] G. Bardet, S. Achard & T. Loret, « A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants », *Toxicology letter*, août 2014, vol. 229, p. 144-149.
- [6] C. Persoz, S. Achard, I. Momas & N. Seta, « Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde », *Toxicology Letters*, juin 2012, vol. 211 n° 2, p. 159-163.
- [7] S. Faruqi, R. Wilmot, C. Wright & A.H. Morice, « Serum LDH in chronic cough: a potential marker of airway inflammation », *The Clinical Respiratory Journal*, avril 2012, vol. 6, p. 81-87.