



HAL
open science

Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires

Margaux Cochard

► **To cite this version:**

Margaux Cochard. Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires. Médecine humaine et pathologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2023. Français. NNT : 2023DUNK0659 . tel-04413850

HAL Id: tel-04413850

<https://hal.science/tel-04413850>

Submitted on 28 Mar 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.



THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie Santé (ED 585)

De l'Université du Littoral Côte d'Opale

Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEiV UR4492)

Par

Margaux COCHARD

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires

Soutenue le 27/03/2023, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Composition du jury :

Pr. Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur, Université Paris Cité

Pr. Françoise PONS, Professeur, Université de Strasbourg

Pr. Myriam POLETTE, Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier, INSERM

Pr. Maurizio GUALTIERI, Chargé de Recherches HDR, Université de Milan Bicocca

Dr. Hélène DESQUEYROUX, ADEME

Pr. Frédéric LEDOUX, Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale

Dr. Yann LANDKOCZ, Maître de Conférences, Université du Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invitée

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse



Remerciements

Le doctorat marque pour moi la fin de mon parcours académique, et aura été une expérience plus qu'enrichissante. Arrivant au terme de ce projet je tiens, à travers ces quelques lignes, à remercier les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ma thèse, le Pr Armelle Baeza-Squiban et le Pr Françoise Pons pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche. Merci au Pr Myriam Polette et au Pr Maurizio Gualtieri de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs, mais aussi d'avoir été présents durant ces trois ans lors de mes nombreux comités de suivis individuels. Vos conseils, votre expérience et votre bienveillance ont été un énorme atout pour m'aider à mener à bien mes travaux. Je me dois également de remercier le Dr Hélène Desqueyroux pour sa présence en tant qu'ingénieur référent de l'ADEME, surtout lors des comités de suivi de thèse. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance lors de nos multiples rencontres.

Je tiens à remercier particulièrement le Pr Frédéric Ledoux, mon directeur de thèse. Merci pour cette opportunité d'effectuer mon doctorat au sein de l'équipe CTEA. Tu as été très présent pour moi durant ces 3 ans, malgré tes nombreuses occupations qui sont arrivées au cours de ma thèse. Merci pour ton aide précieuse concernant toute la partie chimie, autant sur la pratique, que la théorie, pour ton recul sur la partie toxicologie, et pour m'avoir permis de m'essayer à l'enseignement. Tu as surtout su m'aider à rebondir malgré les multiples péripéties qui auront marqué ma thèse ! Merci pour ta patience et ton oreille attentive quand j'en avais le plus besoin.

Mes remerciements les plus sincères pour mon deuxième directeur de thèse, le Dr Yann Landkocz. Yann, merci pour tout. J'ai passé des années merveilleuses, à travailler sur un projet qui m'a énormément plu, ton premier ! Ta présence a été pour moi primordiale autant sur le plan professionnel que privé. Merci pour toutes nos discussions scientifiques et ta présence lors de mes manips, y compris pendant les week-ends, les vacances et les jours fériés ! Cette thèse pendant le Covid n'aura pas été de tout repos, mais tu m'as poussée à aller plus loin, et je t'en remercie, surtout pour toute cette expérience que j'ai acquise lors des congrès auxquels nous avons pu participer. Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse.

J'ai eu la chance d'avoir un encadrement de thèse hors norme avec vous deux aux commandes. Merci à tous les deux, j'espère de tout cœur que mon avenir scientifique ne se fera pas sans vous.

Je tiens à remercier également les membres du Centre Commun de Mesures pour leur aide sur ce projet, notamment lors des prélèvements et de l'analyse des particules. Merci à Fabrice Cazier, Paul Genevray, Dorothee Dewaele et Coralie Pusca. Merci au Pr Pierre Gosset pour m'avoir aidée pour l'immunohistochimie lors de l'étude de la TEM. Un grand merci au Pr Dominique Courcot, pour sa présence et ses conseils judicieux tout au long de ce projet. Je sais que ces dernières années n'ont pas été faciles, mais tu as toujours gardé le sourire et tu t'es toujours préoccupé de nous. Merci d'avoir été là. Je me dois de remercier Célia Zimmer, ma super stagiaire ! J'espère avoir été à la hauteur, et j'espère que tu continueras sur la même voie ! Et merci à Amélie Ferté pour tout le travail que tu as pu réaliser sur ce projet, tu as été une aide importante pour moi.

J'ai pu avoir plusieurs responsabilités pendant cette thèse, et je tiens à remercier les personnes qui m'ont poussée à prendre part dans ces différents postes. Merci au Pr Stéphane Siffert, directeur de l'UCEiV, qui a su écouter toutes mes demandes concernant les doctorants lors des conseils d'unité. Merci aussi au Pr Arnaud Cuisset qui m'a permis de découvrir toutes les facettes de la recherche, notamment celle du conseil de l'école doctorale.

Merci aux membres permanents de l'équipe CTEA, Dr Anthony Verdin, Dr Marc Fadel et Dr Syvlain Billet, pour leurs discussions et tous ces moments partagés. Marc tu en fais désormais parti, mais tu resteras pour moi le doctorant avec lequel j'ai passé de très bons moments dans le bureau des fous. Merci pour ton aide précieuse durant ces longues journées et soirées ! Je tiens également à remercier le Pr François Delattre et le Pr Pascal Masselin, pour tous vos conseils avisés et les bons moments passés en votre compagnie.

Merci à Marianne, qui m'aura accompagnée les premières années, je n'oublierai pas ta joie de vivre et ta ténacité.

Je tiens à remercier les doctorants de mon équipe, Stéphanie, Nour, Salimata, Yamina, Malak, Suen. Vous avez toutes réussi à me supporter (bravo !), et votre présence, votre bonne humeur et nos rigolades ont été pour moi indispensables au bon déroulement de ma thèse. Je tiens à remercier particulièrement Clémence, c'est avec toi que tout a commencé, merci de m'avoir confortée dans le choix de cette thèse, mais aussi de ta présence du début à la fin ! Tu mérites le meilleur. Une pensée va également à tous les autres doctorants qui ont été présents durant ces 3 ans, Tarek, Muriel, Rebecca, Bastien, Caroline, Manon, Lamia, Perrine, et j'en oublie certainement ! Merci pour toutes ces soirées passées ensemble et tous ces bons moments !

Ces remerciements ne seraient pas complets sans quelques mots pour mes proches. Merci à mes parents d'avoir rendu tout cela possible, votre soutien m'a permis d'aller au-delà de ce que je pensais possible. Papa, merci pour ta confiance et ta rigueur, Maman, merci pour ton amour et tes encouragements. Emma, ma petite sœur qui a toujours su me faire rire et qui sans s'en rendre compte m'a apporté énormément. J'ai également une grande pensée pour tout le reste de ma famille, que j'espère rendre fière par l'achèvement de ce travail.

Merci du fond du cœur à mes amis qui ont traversé les contrées nordiques pour venir me changer les idées, et pour votre soutien inconditionnel, malgré la distance.

Enfin, merci à celui qui partage désormais mon quotidien. Antoine, tu auras été présent pour moi plus que quiconque, merci pour ta présence et ta patience.

Soutien financier

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet « ToxTEM » financé par l'ADEME (Convention n°1962C0005) dans le cadre du PNR-EST de l'ANSES. La thèse a été financée à part égale par l'ADEME et la région Hauts-de-France.



Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES.....	V
ABREVIATIONS.....	IX
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES.....	XIII
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART.....	9
1. CARACTERISTIQUES DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES.....	9
1.1. Classification des particules atmosphériques.....	9
1.2. Origine des particules fines	9
1.3. Composition chimique des particules.....	11
1.3.1. La fraction carbonée	11
1.3.2. La fraction inorganique.....	12
1.3.3. La fraction organique.....	13
1.4. Situation locale des PM _{2,5} dans la région Hauts-de-France.....	14
2. INTERACTION DES PM _{2,5} AVEC LES VOIES RESPIRATOIRES	17
3. IMPACT DES PM _{2,5} SUR LA SANTE HUMAINE	18
4. MECANISMES DE TOXICITE INDUITS PAR LES PM _{2,5}	19
4.1. La mort cellulaire.....	20
4.2. La génotoxicité et la mutagénicité	21
4.3. Inflammation.....	22
4.4. Le stress oxydant	23
4.5. Métabolisation des xénobiotiques	26
5. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE (TEM).....	27
5.1. Définition de la TEM.....	27
5.2. Voies de signalisation impliquées dans la TEM.....	29
5.3. Marqueurs de TEM, surface, cytosquelette, environnement et génétique.....	31
6. IMPLICATION DE LA TEM DANS LES MALADIES PULMONAIRES.....	34
6.1. La TEM et l'asthme.....	34
6.2. La TEM et la broncho-pneumopathie chronique obstructive.....	35
6.3. TEM et progression du cancer du poumon.....	36
7. LA TEM INDUITE PAR LES PM _{2,5} , ETUDES <i>IN VITRO</i>	38

7.1.	<i>Vue globale des études disponibles</i>	38
7.1.1.	Sources et origines des PM _{2,5}	39
7.1.2.	Extraction des PM _{2,5}	39
7.1.3.	Méthodes d'exposition	39
7.2.	<i>Regard critique et biais potentiels</i>	43
7.2.1.	Les modèles cellulaires de TEM	43
7.2.2.	Les méthodes de culture cellulaire	44
7.2.3.	Les méthodes d'exposition aux PM _{2,5}	45
7.3.	<i>Choix d'un témoin positif</i>	46
7.4.	<i>Mise en évidence de la TEM induite par les PM_{2,5}</i>	47
7.5.	<i>Relation entre composition des PM_{2,5} et TEM</i>	49
8.	OBJECTIFS DE LA THESE	53
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES		57
1.	ÉCHANTILLONNAGE, MESURE ET ANALYSE DES PM _{2,5}	57
1.1.	<i>Campagnes de prélèvement</i>	58
1.1.1.	Site de typologie urbaine : Lille.....	58
1.1.2.	Site de typologie trafic routier : Roubaix	59
1.1.3.	Site sous influence du trafic maritime : Calais	59
1.1.4.	Site sous influence de l'industrie : Dunkerque	61
1.2.	<i>Méthodes d'échantillonnage et données météorologiques</i>	62
1.2.1.	Conditionnement du matériel de prélèvement	62
1.2.2.	Prélèvement des particules	62
1.2.3.	Données météorologiques.....	63
2.	CONDITIONS PARTICULIERES SUR LES SITES DE PRELEVEMENT.....	63
3.	EXTRACTION DES PARTICULES.....	65
3.1.	<i>Sélection des filtres</i>	65
3.2.	<i>Conditionnement du matériel d'extraction</i>	66
3.3.	<i>Extraction de la fraction organique</i>	66
3.4.	<i>Extraction de la fraction hydrosoluble</i>	68
4.	ANALYSES CHIMIQUES	70
4.1.	<i>Quantification du carbone total</i>	70
4.2.	<i>Ions hydrosolubles</i>	70
4.2.1.	Conditionnement du matériel d'analyse	71
4.2.2.	Extraction des échantillons	71
4.2.3.	Chromatographie ionique.....	71
4.2.4.	Limite de détection et validation des résultats.....	72
4.3.	<i>Éléments inorganiques</i>	73

4.3.1.	Conditionnement du matériel d'analyse	73
4.3.2.	Minéralisation des échantillons	73
4.3.3.	ICP optique	73
4.3.4.	ICP-MS	74
4.3.5.	Validation des résultats	75
4.4.	<i>Étude des composés organiques</i>	75
4.4.1.	Analyse par GC-MS	75
4.4.2.	Validation de la méthode d'extraction et d'analyse	76
4.5.	<i>Étude des endotoxines</i>	76
5.	POTENTIEL OXYDANT	77
5.1.	<i>Test à l'acide ascorbique</i>	78
5.2.	<i>Test au dithiothréitol</i>	78
6.	CULTURE DES CELLULES PULMONAIRES	79
6.1.	<i>Modèles cellulaires</i>	79
6.1.1.	Cellules BEAS-2B	79
6.1.2.	Cellules A549	79
6.2.	<i>Culture des modèles cellulaires</i>	79
6.3.	<i>Exposition cellulaire</i>	80
6.3.1.	Exposition aiguë in vitro.....	80
6.3.2.	Exposition subaiguë in vitro	80
6.3.3.	Témoins positifs et négatifs	82
7.	REPONSE CELLULAIRE SUITE A L'EXPOSITION AUX EXTRAITS DE PARTICULES	83
7.1.	<i>Cytotoxicité des extraits de PM_{2.5}</i>	83
7.1.1.	Evaluation de la mortalité cellulaire	83
7.1.2.	Evaluation de la viabilité cellulaire.....	84
7.1.3.	Evaluation de la prolifération cellulaire	85
7.2.	<i>Étude des mécanismes de toxicité induits par les PM_{2.5}</i>	85
7.2.1.	Évaluation de l'expression génique par RT-qPCR.....	85
7.2.2.	Quantification de la production de cytokines pro-inflammatoires.....	87
7.2.3.	Quantification de la réponse antioxydante par le glutathion	88
7.2.4.	Quantification de l'activité des cytochromes P450.....	89
8.	VALIDATION DES CONDITIONS D'EXPOSITION POUR L'ETUDE DE LA TEM	89
8.1.	<i>Étude morphologique</i>	89
8.2.	<i>Étude des biomarqueurs</i>	91
8.2.1.	Étude des marqueurs de TEM par western blot	91
9.	ANALYSES STATISTIQUES ET TRAITEMENT DE DONNEES	92

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DES PM_{2.5} PRELEVEES SOUS LES 4 INFLUENCES..... 95

1.	NIVEAUX DE CONCENTRATION ET COMPOSITION DES PM _{2.5} ECHANTILLONNEES	95
----	-------------------------------------------------------------------------------------	----

1.1.	<i>Variations des concentrations de PM_{2.5} durant l'échantillonnage</i>	95
1.2.	<i>Étude de l'origine géographique des PM_{2.5}</i>	97
1.3.	<i>Composition chimique des PM_{2.5} collectées</i>	98
1.3.1.	Espèces inorganiques et carbone total	98
1.3.2.	Composés organiques	103
2.	IDENTIFICATION DES SOURCES ET DE LEURS CONTRIBUTIONS.....	113
2.1.	<i>Conditions opératoires pour réaliser la PMF</i>	113
2.2.	<i>Choix des espèces retenues et nombre de sources identifiées selon les jeux de données</i>	114
2.3.	<i>Profils de sources identifiés</i>	115
2.4.	<i>Contributions des sources</i>	121

CHAPITRE 4 : ÉTUDE DES MECANISMES DE REPONSES INDUITS PAR LES PM_{2.5}.....129

1.	ÉTUDE DE LA CYTOTOXICITE SUR LES CELLULES PULMONAIRES DES PM _{2.5} SELON LES 4 INFLUENCES	129
2.	REPONSE INFLAMMATOIRE INDUITE PAR LES EXTRAITS DE PM _{2.5}	131
2.1.	<i>TNF-α</i>	132
2.2.	<i>IL-1β</i>	133
2.3.	<i>IL-6</i>	137
2.4.	<i>IFN-γ</i>	141
3.	STRESS OXYDANT ET REPONSE ANTIOXYDANTE SUITE A L'EXPOSITION AUX EXTRAITS DE PM _{2.5}	142
3.1.	<i>Potentiel oxydant – réponse acellulaire</i>	142
3.2.	<i>Réponse antioxydante cellulaire</i>	144
3.2.1.	Oxydation du glutathion	145
3.2.2.	Induction génique des enzymes antioxydantes	149
4.	REPONSE METABOLIQUE APRES EXPOSITION AUX PM _{2.5}	152
4.1.	<i>Induction génique de la réponse métabolique</i>	152
4.2.	<i>Activité métabolique des CYP450</i>	157
5.	DISCUSSION	161

CHAPITRE 5 : ÉTUDE DE L'IMPACT DES PM_{2.5} SUR LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE

.....171

1.	ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES CELLULES EXPOSEES AUX EXTRAITS DE PM _{2.5}	171
2.	ÉTUDE DES MARQUEURS EPITHELIAUX ET MESENCHYMATEUX	173
2.1.	<i>Quantification des protéines</i>	173
3.	DISCUSSION	177

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....183

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....191

ANNEXES.....227

Liste des tableaux

Tableau 1 : Estimation de l'apport des émissions mondiales des particules atmosphériques selon les sources (d'après (Delmas <i>et al.</i> 2007))	10
Tableau 2 : Activation des cytochromes P450 (CYP450) par les familles de xénobiotiques et récepteurs impliqués.	26
Tableau 3 : Biomarqueurs épithéliaux et mésenchymateux selon le type de TEM	32
Tableau 4 : Caractéristiques des PM _{2.5} disponibles (*tous les échantillons de PM sont des PM _{2.5} exceptés les SRM) dans les études liées à la TEM <i>in vitro</i>	40
Tableau 5 : Composition des PM _{2.5} (*tous les échantillons sont des PM _{2.5} exceptés les SRM) utilisés dans les études d'induction de TEM <i>in vitro</i> . Les composants des PM _{2.5} sont classés par famille (métaux, HAP, endotoxines, carbone et ions) et présentés par ordre d'abondance. (Il est important de noter que les informations données correspondent aux espèces analysées et non à la composition complète des PM _{2.5})	50
Tableau 6 : Synthèse des prélèvements de PM _{2.5}	62
Tableau 7 : Evènements particuliers ayant eu lieu au cours des prélèvements de particules à Lille et Roubaix (du 29/09/20 au 19/11/20) et à Dunkerque et Calais (du 21/11/20 au 14/01/21) (* : événements liés au COVID-19).....	65
Tableau 8 : Quantités de lyophilisat obtenues suite à l'extraction hydrosoluble	70
Tableau 9 : Limites de détection de la chromatographie ionique pour les ions analysés (en mg.L ⁻¹).....	72
Tableau 10 : Gamme de concentrations des éléments d'étalonnage, longueur d'onde et limite de détection de ces éléments	74
Tableau 11 : Taux de recouvrement en pourcentage de l'échantillon certifié SRM 1648a pour l'ICP AES	75
Tableau 12 : Taux de recouvrement en pourcentage de l'échantillon certifié SRM 1648a pour l'ICP MS	75
Tableau 13 : Hydrocarbures aromatiques polycycliques étudiés par GC-MS.....	76
Tableau 14 : Concentration des extraits hydrosolubles en endotoxines (UE.m ⁻³).....	77
Tableau 15 : Ensemble des témoins positifs et négatifs utilisés au cours des expérimentations de toxicologie	82
Tableau 16 : Références des amorces TaqMan utilisées pour les qPCR.....	87
Tableau 17 : Anticorps utilisés pour les western blot	92
Tableau 18 : Concentration en éléments inorganique et carbone total pour chaque influence, en moyenne pour la période de prélèvement (ng.m ⁻³).	99

Tableau 19 : Estimation de la contribution des cires (Wax) provenant des végétaux dans les PM _{2.5} collectées sous différentes influences	106
Tableau 20 : Somme des concentrations de HAP de combustion (C _{HAP}) et totaux (T _{HAP}), ratios des HAP issus des différentes influences et équivalent toxique en BaP (BaP TEQ). (C _{HAP} : Flu + Pyr + Chr + B[a]A + B[b]F + B[k]F + B[a]P + InPy + B[g,h,i]Pe)	109
Tableau 21 : Concentration en oxy-HAP et nitro-HAP dans les PM _{2.5} sous différentes influences (en ng.m ⁻³) (LDD : limite de détection ; LDQ : limite de quantification).	111
Tableau 22 : Quantité de phtalates et de bisphénol A dans les extraits organiques sous les différentes influences (en ng.m ⁻³) (LDD : limite de détection).....	112
Tableau 23 : Nombre d'échantillons et liste des espèces retenues pour l'obtention du nombre des sources et l'identification des profils par PMF.	115
Tableau 24 : Contributions moyennes des sources de PM _{2.5} sur les 4 sites sous influence maritime et portuaire, industrielle, urbaine et du trafic routier, ainsi que sous influences spécifiques(µg.m ⁻³).	124
Tableau 25 : CL ₅₀ des différents extraits organiques et hydrosolubles sur les cellules A549 et BEAS-2B, estimées à partir de la viabilité cellulaire (n= 3).	130
Tableau 26 : Expression génique de TNF-α, calculée selon la méthode ΔΔC _q (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 µg eq PM.cm ⁻² pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert la sous-expression (RQ<0,5).....	132
Tableau 27 : Présence de l'interleukine-1β supérieur à la limite de quantification (LDQ) pour les cellules A549 exposées aux extraits organiques et hydrosolubles de PM _{2.5} (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (+ : valeur > LDQ ; - : valeur ≤ LDQ) 133	133
Tableau 28 : Expression génique de IL-1β, calculée selon la méthode ΔΔC _q (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules A549 et BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 µg eq PM.cm ⁻² pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).....	136
Tableau 29 : Expression génique de l'interleukine-6, calculée selon la méthode ΔΔC _q (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules A549 et BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 µg eq PM.cm ⁻² pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).....	140
Tableau 30 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode ΔΔC _q (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques de	

PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5)..... 150

Tableau 31 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5)..... 150

Tableau 32 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5)..... 151

Tableau 33 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5)..... 151

Tableau 34 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5). 154

Tableau 35 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5). 154

Tableau 36 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5). 156

Tableau 37 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits hydrosolubles de $PM_{2.5}$ à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression ($RQ>2$) et en vert pour la sous-expression ($RQ<0,5$).	156
Tableau 38 : Récapitulatif des résultats des mécanismes de réponses induits (■) ou inhibés (■) suite à l'exposition des cellules A549 aux extraits de $PM_{2.5}$ (■ non effectués, G : gène, P : protéine).	162
Tableau 39 : Récapitulatif des résultats des mécanismes de réponses induits (■) ou inhibés (■) suite à l'exposition des cellules BEAS-2B aux extraits de $PM_{2.5}$ (■ non effectués, G : gène, P : protéine).	163
Tableau 40 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits organiques de $PM_{2.5}$ à 1 et 10 $\mu g PM eq.cm^{-2}$ pendant 3 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.	175
Tableau 41 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits organiques de $PM_{2.5}$ à 1 et 10 $\mu g PM eq.cm^{-2}$ pendant 7 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.	175
Tableau 42 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de $PM_{2.5}$ à 1 et 10 $\mu g PM eq.cm^{-2}$ pendant 3 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.	176
Tableau 43 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de $PM_{2.5}$ à 1 et 10 $\mu g PM eq.cm^{-2}$ pendant 7 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.	176

Liste des figures

Figure 1 : Sources des PM _{2.5} et composés primaires et secondaires formés. (HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, COV : composés organiques volatils)	10
Figure 2 : Émissions de PM _{2.5} provenant du trafic maritime dans les eaux territoriales de France métropolitaine (adapté de Environmental aspects of maritime transport, European Environment Agency. and European Maritime Safety Agency., 2021).....	15
Figure 3 : Inventaire des rejets canalisés de poussière des sites industriels de la région Hauts-de-France en 2017 (Bilan d'activité annuel 2018, DREAL Hauts-de-France, 2019)	16
Figure 4 : Schéma des régions trachéobronchique et alvéolaire (adapté de la ligue contre le cancer)	17
Figure 5 : Mécanismes intracellulaires connus de toxicité des particules fines (PM _{2.5}) (Cochard <i>et al.</i> 2020).....	19
Figure 6 : Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intra et extracellulaires	23
Figure 7 : Mécanismes de défense enzymatique et non-enzymatique contre le stress oxydant.	24
Figure 8 : Évolution du phénotype cellulaire d'une cellule en transition épithélio-mésenchymateuse (Cochard <i>et al.</i> 2020)	28
Figure 9 : Cascades de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Cochard <i>et al.</i> 2020)	30
Figure 10 : Localisation des 4 sites de prélèvement de PM _{2.5} des campagnes de mesure ..	57
Figure 11 : Localisation du site de prélèvement sous influence urbaine à Lille Fives et rose des vents au cours de la campagne	58
Figure 12 : Localisation du site de prélèvement sous influence trafic routier à Roubaix et rose des vents au cours de la campagne	59
Figure 13 : Localisation du site de prélèvement sous influence maritime à Calais et rose des vents au cours de la campagne d'échantillonnage	60
Figure 14 : Localisation du site de prélèvement sous influence industrielle, localisé à Fort Mardyck dans l'agglomération de Dunkerque (1 : industrie sidérurgique intégrée, 2 : usine de ferromanganèse ; 3 : cimenterie ; 4 : industrie de polypropylène) et rose des vents au cours de la période d'étude	62
Figure 15 : Nombre de rotations quotidiennes des ferrys dans le Port de Calais au cours de la période d'échantillonnage	64
Figure 16 : Extraction organique des filtres contenant les particules fines.	67
Figure 17 : Extraction aqueuse des filtres contenant les particules fines	69

Figure 18 : Balance ionique pour les échantillons de particules prélevés sur l'ensemble des sites (n=225)	72
Figure 19 : Différents scenarii d'exposition sur 7 jours pour une dose finale à 10 µg eq PM.cm : continues et discontinues en doses unique, cumulées ou répétées.....	81
Figure 20 : Principe de l'oxydation et de la réduction du glutathion.....	88
Figure 21 : Cellules A549 mises en culture à 5 000 cellules.cm ² , non-exposées et exposées à TGF-β pendant 72 h colorées en HE, observées au microscope photonique	90
Figure 22 : Évolution de la concentration en PM _{2.5} sur la période d'échantillonnage à Lille et Roubaix, et précipitations à Lille Lesquin (* : épisode de pollution (Atmo))	96
Figure 23 : Évolution de la concentration en PM _{2.5} sur la période d'échantillonnage à Calais et Dunkerque, sur les stations Atmo les plus proches, avec les précipitations de Calais et Dunkerque (* : épisode de pollution (Atmo))	96
Figure 24 : Roses de concentration de PM _{2.5} sur les sites sous influences maritime (du 21/11/20 au 14/01/21), industrielle (du 21/11/20 au 05/01/21), urbaine (du 29/09/20 au 19/11/20) et trafic routier (du 29/09/20 au 19/11/20) (µg.m ⁻³).....	98
Figure 25 : Composition moyenne (%) des PM _{2.5} selon les différentes influences.	101
Figure 26 : Répartition des éléments métalliques selon les sites sous influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifique industrielle (6) en concentration moyenne (ng.m ⁻³).....	102
Figure 27 : Répartition des alcanes présents dans les PM _{2.5} selon les influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifique industrielle (6) en concentration moyenne (ng.m ⁻³), avec les alcanes pairs en bleu et impairs en orange.	105
Figure 28 : Identification des sources des alcanes par utilisation du Carbone preference index (CPI) suivant l'origine des PM _{2.5}	106
Figure 29 : Profils de concentrations des HAP issus des influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifiques industrielle (6) exprimés en moyenne en ng.m ⁻³ à des échelles différentes.....	110
Figure 30 : Profils des sources de PM _{2.5} collectées sur le site sous influence maritime	118
Figure 31 : Profils des sources de PM _{2.5} collectées sur le site sous influence industrielle ..	119
Figure 32 : Profils des sources des éléments de PM _{2.5} collectées sur les sites sous influences urbaine et trafic routier.....	120
Figure 33 : Contributions moyennes des PM _{2.5} sur les 4 sites sous influences maritime, industrielle, urbaine et du trafic routier, ainsi que sous influences spécifiques (%).	125
Figure 34 : Induction cytokinique de l'interleukine-1β par rapport au témoin, par des cellules BEAS-2B exposées à 1 et 10 µg eq PM.cm ⁻² d'extraits organiques et hydrosolubles pendant 6	

et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (* : $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn).....	135
Figure 35 : Induction cytokinique de IL-6 par rapport au témoin, par des cellules A549 et BEAS-2B exposées à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ d'extraits organiques pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (* : $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn).....	138
Figure 36 : Induction cytokinique de l'interleukine-6 par rapport au témoin, par des cellules A549 et BEAS-2B exposées à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ d'extraits hydrosolubles pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (* : $p < 0,05$ test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn).....	139
Figure 37 : Potentiel oxydant (OP) des extraits hydrosolubles et organiques obtenus par la méthode à l'acide ascorbique (n=3).....	142
Figure 38 : Potentiel oxydant (OP) des extraits hydrosolubles et organiques obtenus selon la méthode au dithiothréitol (n=3).....	143
Figure 39 : Défenses enzymatiques antioxydantes et facteurs de transcriptions impliqués (flèches grises : les réactions enzymatiques ; flèches rouges : les enzymes induites par les différents facteurs de transcription).....	145
Figure 40 : Ratios GSH/GSSG comparés aux témoins sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ pendant 24 à 48 heures (n=3). (* : $p < 0,05$ test ANOVA suivi du test de Dunett)	146
Figure 41 : Ratios GSH/GSSG comparés aux témoins sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ pendant 24 à 48 heures (n=3). (* : $p < 0,05$ test ANOVA suivi du test de Dunett)	147
Figure 42 : Activité des CYP450 de la famille 1 dans les cellules A549 exposées pendant 24 et 48 heures aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ (n=3). (* : $p < 0,05$ test ANOVA suivi du test de Dunett)	159
Figure 43 : Activité des CYP450 de la famille 1 dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 et 48 heures aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ (n=3). (* : $p < 0,05$ test ANOVA suivi du test de Dunett).....	160
Figure 44 : Étude morphologique des cellules A549 exposées pendant 7 jours, fixées et colorées selon la méthode hématoxyline éosine. a. A549 non-exposées. b. A549 exposées au témoin positif TGF- β à 10 ng.mL^{-1} . c. A549 exposées à l'extrait organique sous influence trafic routier à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$. d. A549 exposées à l'extrait hydrosoluble sous influence trafic routier à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	172
Figure 45 : Western blot des cellules A549 exposées 7 jours aux extraits à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ selon les différentes influences, avec révélation des protéines E-cadhérine et N-cadhérine.	174

Abréviations

AA	Acide ascorbique
Abs	Absorbance
AFAA	Alcool Formolé Acétique
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
AhRR	Récepteur de l'AhR
AKT	Protéine Kinase B
AP-1	Activator Protein 1
ARE	Élément de réponse aux antioxydants
α -SMA	α Smooth Muscle Actin
ATCC	American Type Culture Collection
BaP	Benzo(a)pyrène
BCA	BiCinchoninic acid Assay
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPCO	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CAR	Chimeric Antigen Receptors
CAT	Catalase
C _{HAP}	HAP de combustion
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CL ₁₀	Concentration Létale 10 %
CL ₅₀	Concentration Létale 50 %
COV	Composés Organiques Volatiles
CPI	Carbone Preference Index
C _q	Cycle de quantification
CYP450	Cytochrome P450
DAE	Diamètre Aérodynamique Equivalent
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNTB	5,5-dithio-bis-[acide 2-nitrobenzoïque]
DREAL	Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
DTT	Dithiothréitol
EC	Carbone élémentaire
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EPHX1	Époxyde hydrolase 1
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
Gli1	Glioma-associated oncogene 1
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Disulfure de Glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HdF	Hauts-de-France

HE	Hemalun Eosine
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
HMOX1	Hème oxygénase 1
HQ	Hydroquinone
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50 %
IFN- γ	Interféron- γ
IL	Interleukine
ILK	Integrin-Linked Kinase
JAK/STAT3	Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription 3
JNK	JUN N-terminal kinase
LDD	Limite De Détection
LDH	Lactate Déshydrogénase
LDQ	Limite De Quantification
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LPS	LipoPolySaccharides
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
miR	micro RNA
MKK	MAP Kinase Kinase
MMP	Métalloprotéinases matricielles
mTORC2	mammalian TOR Complex2
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite
NF- κ B	Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NIST	National Institute of Standards and Technology
NLR	Récepteur de type NOD
NQO1	NADPH Quinone Oxydoréductase
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
NSCLC	Non-Small Cells Lung Cancer
OC	Carbone Organique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Potentiel Oxydant
OR2S	Observatoire Régional de la Santé et du Social
PBS	Phosphated Buffer Saline
PCB	Polychlorobiphényles
PCDD	Polychlorodibenzo-p-dioxine
PCDF	Polychlorodibenzofurane
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PM	Particulate Matter = Particules Atmosphériques
PM _{0.1}	Particules de diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 0,1 μ m
PM _{2.5}	Particules de diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 2,5 μ m
PM ₁₀	Particules de diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 10 μ m
PMF	Factorisation Matricielle Positive
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTCH1	Patched 1 receptor
PTFE	Polytetrafluoroéthylène
PUFA	Acides gras polyinsaturé
PXR	Pregnane X Receptor

qPCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative
RQ	Quantité Relative
RT	Reverse Transcriptase
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction
SHCA	SRC Homology 2 domain-containing transforming A
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SOD	Superoxyde dismutase
SOS	Son of Sevenless
SRM	Standard Reference Materials
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAK1	TGF- β -Activated Kinase 1
TC	Carbone Totale
TCF	T-cell Factor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TEQ	Equivalent Toxique
TGF- β	Transforming Growth Factor β
T _{HAP}	HAP totaux
TLR	Récepteur de type Toll
TNB	Acide 2-nitro-5-thiobenzoïque
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF6	TNF Receptor-Associated 6
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
US-EPA	Agence américaine de Protection de l'Environnement
UV	Ultraviolet
XRE	Élément de réponse aux xénobiotiques
ZO-1	Zona occludens 1
8-OHdG	8-Hydroxy-2'deoxyguanosine

Valorisations Scientifiques

Articles scientifiques dans le cadre de la thèse :

Cochard, M., Ledoux, F. and Landkocz, Y. (2020) 'Atmospheric fine particulate matter and epithelial mesenchymal transition in pulmonary cells: state of the art and critical review of the *in vitro* studies', *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 23(7), pp. 293–318. doi: 10.1080/10937404.2020.1816238.

Articles scientifiques hors cadre de la thèse :

Bertho, J.-M., Bo, R., Magneron, V., Legendre, A., Cochard, M., Broggio, D. and Tack, K. (2020) 'Co-exposure to internal and external radiation alters cesium biokinetics and retention in mice', *Journal of Radiological Protection*, 40(2), pp. 504–519. doi:10.1088/1361-6498/ab7b43.

Communication orale :

Cochard, M., Ledoux, F., Courcot, D., Landkocz, Y. (2022) 'Impact of airborne particulate matter from port, industrial and urban areas on oxidative and inflammatory responses on lung cells', **ESTIV 2022**, Barcelone, Espagne, 21 au 25 novembre 2022.

Communications affichées :

Cochard, M., Ledoux, F., Courcot, D. and Landkocz, Y. (2022) P13-05 'Toxicity of airborne particulate matter from port, industrial and urban areas on lung cells', **ICT2022**, Maastricht, Pays-Bas, 17 au 21 septembre 2022.

Cochard, M., Ledoux, F., Cazier, F., Gosset, P., Courcot, D. and Landkocz, Y. (2022) P13-04 'Toxicity of airborne particulate matter in port, industrial and urban areas and effects on epithelial to mesenchymal transition' **ICT2022**, Maastricht, Pays-Bas, 17 au 21 septembre 2022.

Cochard, M., Ledoux, F., Gosset, P., Courcot, D. and Landkocz, Y. (2022) 'How does fine particulate matter from 4 distinct origins impact EMT on lung cells?' **TEMTIA X**, Paris, 5 au 7 novembre 2022.

Autres présentations orales :

Cochard, M., Ledoux, F. and Landkocz, Y. (2020) 'Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires, et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse', **Journées 2AD – Association des doctorants et docteurs de l'ADEME**, 21 et 22 octobre 2021.

Cochard, M., Ledoux, F. and Landkocz, Y. (2020) 'Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires, et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse', Présentation : 1 image en 3 minutes, **Journée des doctorants du pôle MTE de l'ULCO**, 1^{er} juillet 2021.

Cochard M. (2022) 'Transition épithélio-mésenchymateuse induite par les particules fines', **Ma thèse en 180 secondes**, Villeneuve d'Ascq, 10 mars 2022.

Cochard, M. (2022) 'Toxicité des particules atmosphériques issues des zones urbano-industrielles et portuaires et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires', Présentation orale aux **Journées des doctorants de l'ADEME**, Angers, 14 au 16 mars 2022.

Cochard M., Ledoux, F. et Landkocz, Y., (2022) 'Epithelial to mesenchymal transition due to fine particulate matter exposure', 1 image en 3 minutes, **Journée des doctorants du pôle MTE de l'ULCO**, 12 juillet 2022, Prix du jury.

Actions de vulgarisation scientifique auprès du grand public :

Participation à la journée nationale de la qualité de l'air (2021), Place Jean Bart, Ville de Dunkerque.

Participation à la fête de la science (2022), Palais de l'Univers et des Sciences de Capelle-la-Grande.

Introduction générale

Introduction générale

La pollution atmosphérique se caractérise par la présence de gaz et de particules dans des concentrations excessives dans l'air. Depuis la révolution industrielle, la concentration en polluants environnementaux a drastiquement augmenté et la qualité de l'air a diminué. Les polluants gazeux les plus préoccupants pour la santé publique sont le monoxyde de carbone, l'ozone, le dioxyde d'azote et le dioxyde de soufre. Les particules atmosphériques (PM) ont également un impact sur la santé, mis en lumière par le smog londonien de 1952 qui a fait plus de 12 000 décès. Cet événement a permis une prise de conscience sur la qualité de l'air par la population (Hunt *et al.* 2003). Aujourd'hui, les particules fines (particules de diamètre aérodynamique équivalent (DAE) inférieur à 2,5 μm ou $\text{PM}_{2.5}$) figurent parmi les polluants les plus préoccupants. La répartition des concentrations de $\text{PM}_{2.5}$ est assez inégale en Europe avec de plus grandes concentrations en Europe de l'Est et au Nord de l'Italie alors qu'en France, les concentrations les plus élevées se situent dans la vallée du Rhône, la région parisienne et la région Hauts-de-France (HdF) (European Environment Agency 2019). Cette région est soumise à de multiples influences, avec plus de 70 % de zones urbaines (INSEE 2017b), un fort trafic routier dû à sa localisation au carrefour de différents pays entraînant un fort transport de personnes et de marchandises. Elle abrite trois des plus grands ports de France qui se situent à Dunkerque (3^{ème} port français), Calais (1^{er} port de transport de personnes en France) et Boulogne-sur-Mer (1^{er} port de pêche français). À cela s'ajoute la forte densité industrielle régionale, favorable pour l'emploi, mais défavorable pour la qualité de l'air, en particulier dans le dunkerquois où l'on retrouve environ 75 % des émissions canalisées de particules de la région (DREAL Hauts-de-France 2020). Ces influences diverses et variées sont également synonymes de variations importantes dans la composition chimique des $\text{PM}_{2.5}$, incluant notamment des ions, des métaux, une fraction carbonée et des composés organiques. Parmi ces espèces, certaines sont rarement étudiées alors qu'elles pourraient être responsables de certains effets sanitaires observés. Par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de haut poids moléculaire, les oxy- et nitro-HAPs, les phtalates ou les bisphénols peuvent être retrouvés dans l'air, y compris dans les $\text{PM}_{2.5}$ (Fu and Kawamura, 2010; Ma *et al.*, 2014), et sont connus pour leurs effets sur l'appareil respiratoire (Jaakkola and Knight, 2008; Bornehag and Nanberg, 2010; Koike, Yanagisawa and Takano, 2014; Kim *et al.*, 2018).

En France, 33 100 décès prématurés seraient liés à l'exposition aux $\text{PM}_{2.5}$ (European Environment Agency. 2020), tandis qu'en région HdF, le gain d'espérance de vie dans un scénario sans pollution anthropique est estimé à 16 mois en moyenne, avec d'importantes

Introduction générale

inégalités géographiques (Provost and Heyman, 2016). Durant ces 60 dernières années, les études ont montré une corrélation entre exposition aux polluants atmosphériques et développement de maladies respiratoires sévères comme l'asthme ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Loftus *et al.*, 2015; Guan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Les particules fines peuvent altérer plusieurs activités biologiques dans le poumon et perturber l'homéostasie cellulaire jusqu'à favoriser l'apparition de maladies graves. De plus, les PM_{2.5} ont été classées cancérigènes par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 2013 (Loomis *et al.*, 2013). Des études épidémiologiques suggèrent en effet que la pollution atmosphérique, en particulier l'exposition aux particules, est associée à une augmentation du risque de cancer du poumon et de la mortalité (Turner *et al.*, 2011). Selon le dernier rapport de l'observatoire régional de la santé et du social (OR2S), la population en région HdF montre une mortalité par maladies de l'appareil respiratoire et par BPCO jusqu'à 50% plus élevée que la moyenne nationale (OR2S, 2017). Des études ont également montré que l'inflammation et le stress oxydant médiés par les PM_{2.5} sont associés à l'augmentation du nombre de cancers du poumon (Valavanidis *et al.* 2008). Avec un taux de survie à 5 ans d'environ 15%, le cancer broncho-pulmonaire a un mauvais pronostic (Cowppli-Bony *et al.*, 2016). Dans ce contexte, des recommandations portant sur les concentrations de particules dans l'air à ne pas dépasser pour protéger la santé de la population ont été définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), initialement en 2005 et revues à la baisse en 2021. Il semble par ailleurs difficile de définir un seuil de concentration en particules en deçà duquel aucun effet sanitaire ne serait constaté. Des travaux ont montré un risque non négligeable en deçà de 10 µg.m⁻³ d'exposition annuelle aux PM_{2.5}, soit l'ancienne valeur recommandée par l'OMS, et n'atteignant pas de valeurs seuil à 5 µg.m⁻³ (Di *et al.*, 2017). L'OMS a en effet récemment abaissé la recommandation d'exposition aux PM_{2.5} de 10 à 5 µg.m⁻³.

La compréhension des effets des particules atmosphériques PM_{2.5} sur la santé et notamment l'étude des mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans la toxicité constitue donc un thème de recherche majeur et d'actualité. Il s'agit d'une étape importante et nécessaire dans la connaissance et la prévention de l'impact de la pollution atmosphérique sur l'Homme.

Bien que la relation entre niveau de concentration de PM et impact sur la santé est aujourd'hui établie, le lien de causalité entre composition chimique des particules et mécanismes biologiques déclenchés conduisant à la toxicité demeure incomplet. Des études mettent aujourd'hui en avant l'importance de considérer un indicateur différent de la concentration de particules dans l'air, sur lequel se basent les recommandations et normes actuelles, pour mieux rendre compte du degré de nocivité de la pollution atmosphérique (Bates *et al.* 2019 ; Desprésaux *et al.* 2023 ; Wang *et al.* 2020). En effet, cette concentration ne

considère en rien la nature chimique des particules qui, on le sait, conditionne également la toxicité (Bocchi *et al.* 2019 ; Çakmak *et al.* 2019 ; Dergham *et al.* 2015). La plupart des mécanismes de toxicité des particules font intervenir en 1^{er} lieu un stress oxydant et parmi les éventuels indicateurs, la mesure du potentiel oxydant, tenant compte des propriétés rédox des constituants des PM, peut être proposée (Crobeddu *et al.*, 2017). Les caractéristiques physico-chimiques des particules dépendent de leur processus de formation et de leurs origines qui peuvent être diverses, notamment dans un espace multi-influencé comme la région HdF.

Plusieurs mécanismes comme le stress oxydant, les dommages à l'ADN et la mutagenicité ont été proposés pour interpréter et expliquer les effets toxiques des PM_{2.5} sur les poumons. Cependant, peu d'études ont mis l'accent sur des mécanismes plus tardifs comme la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et qui peut être induite sur des cellules épithéliales pulmonaires suite à une exposition aux PM_{2.5}. Ce processus biologique est réversible et se traduit par le changement phénotypique des cellules épithéliales, les cellules qui bordent la lumière pulmonaire pour former une barrière, en cellules mésenchymateuses ayant la capacité de se mouvoir dans les tissus conjonctifs (Kalluri et Weinberg 2009 ; Yang *et al.* 2020). Cette transition se caractérise par un changement morphologique et par le gain et la perte de certains marqueurs spécifiques (Zeisberg et Neilson 2009).

La TEM est par ailleurs fréquemment associée aux pathologies comme la fibrose et impliquée dans la métastase des cancers (Kalluri et Weinberg, 2009). Elle intervient également dans l'apparition de maladies pulmonaires chroniques comme l'asthme et la BPCO (Hackett 2012 ; Pain *et al.* 2014). Il existe différents types de TEM, physiologiques et pathologiques. La TEM de type 1 est physiologique et intervient lors des phases embryonnaires. La TEM de type 2 est un processus de régénération tissulaire, tels que les phénomènes de cicatrisation, et intervient souvent après une forte inflammation. L'asthme, la BPCO et la fibrose sont des TEM de type 2. On retrouve la TEM de type 3 lors de l'invasion et la migration des cellules cancéreuses sous forme de métastases. Ainsi, lorsque les cancers des poumons forment des métastases, soit dans 80 % des cancers des poumons (IARC 2020), une TEM de type 3 se produit.

La bibliographie est aujourd'hui encore insuffisante concernant la TEM induite par la pollution de l'air. De plus, dans les quelques travaux disponibles, la plupart des auteurs utilisent une méthodologie différente pour leur étude, que ce soit dans la manière de considérer les particules ou de les extraire, ou d'exposer les cellules pulmonaires aux PM_{2.5}. Le manque d'harmonisation ne permet pas de corroborer les résultats des différentes études. De plus, la plupart des études manquent de témoins positifs et ne respectent pas les lignes directrices pour s'assurer de la mise en place effective de la TEM (Yang *et al.* 2020). Enfin, il ne semble

Introduction générale

pas exister à l'heure actuelle, de relation entre l'un des composants chimiques présents sur les PM_{2.5} et l'induction du mécanisme de TEM.

Dans ce contexte, cette thèse aura pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition de pathologies respiratoires en lien avec une exposition aux polluants atmosphériques. En particulier, nous nous intéresserons à la Transition Épithélio-Mésenchymateuse, connue pour intervenir dans l'apparition de la BPCO et du cancer du poumon. Il s'agira 1) d'étudier la composition physico-chimique de PM_{2.5} collectées sous influence urbaine, industrielle, maritime et du trafic routier, 2) de déterminer la toxicité de ces particules en s'appuyant sur des indicateurs cellulaires mettant en évidence les voies de métabolisation/biotransformation activées, 3) d'étudier le mécanisme de TEM sur des cellules pulmonaires exposées de façon aiguë ou subaiguë à ces particules collectées sous différentes influences et 4) d'identifier les relations existantes entre la nature des polluants atmosphériques et les réponses biologiques y compris l'induction de la TEM.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme encore peu étudié et récent. Son étude en lien avec l'exposition aux particules atmosphériques est une nouveauté et permettra d'apporter de plus amples connaissances fondamentales sur le lien entre l'exposition aux PM_{2.5} et les maladies pulmonaires associées.

Ce travail de thèse est mené en parallèle du projet ToxTEM, tous deux financés par l'ADEME. Ils s'ancrent dans l'un des cinq programmes principaux de l'ADEME, « Qualité de l'air, impacts sur la santé et l'environnement » tant par l'aspect caractérisation de la pollution atmosphérique extérieure, que par l'aspect impact sur la santé.

Ce manuscrit est divisé en 5 chapitres :

- Le premier chapitre reprend la synthèse des connaissances actuelles sur les particules atmosphériques fines, leurs interactions et impacts sur les poumons, ainsi que les mécanismes induits, notamment la transition épithélio-mésenchymateuse. Plusieurs notions concernant la transition épithélio-mésenchymateuse seront introduites, avant d'aborder les premiers travaux publiés dans la littérature associant l'exposition de cellules pulmonaires aux particules fines et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse.
- Le deuxième chapitre présente les méthodes de prélèvement, d'analyse et d'extraction des particules. Les conditions de culture et d'exposition cellulaire, ainsi que les tests de toxicité et d'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse y sont abordées.
- Le troisième chapitre se concentre sur les caractéristiques chimiques des particules fines, l'analyse des éléments et composés présents dans ces échantillons et les liens qui existent entre les différentes influences et les sources d'émissions de particules.
- Le chapitre quatre présente les résultats de l'exposition des cellules aux particules. La cytotoxicité et l'analyse des mécanismes de métabolisation des xénobiotiques, de réponse au stress oxydant et d'inflammation induits sur les cellules par l'exposition aux fractions particulaires y sont abordés.
- Le cinquième chapitre porte enfin sur l'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules exposées aux fractions organiques et hydrosolubles des particules atmosphériques.
- Le manuscrit se termine par une discussion générale suivie d'une conclusion et de perspectives.

Chapitre 1 :

État de l'art

Chapitre 1 : État de l'art

1. Caractéristiques des particules atmosphériques

La pollution atmosphérique demeure une préoccupation environnementale majeure notamment en raison de sa capacité à nuire à la santé. Les niveaux de concentration de particules atmosphériques sont l'indicateur le plus fréquemment utilisé pour qualifier la pollution de l'air à l'échelle mondiale. Toutefois, il n'existe aucune harmonisation sur les normes définissant la qualité de l'air entre les pays et les continents. Pendant que 94 % des pays d'Europe ont au moins une norme pour chaque polluant, seulement 36 % des pays africains ont la même chose (Kutlar Joss *et al.* 2017). De plus, la plupart des normes ont été fixées à des valeurs supérieures à celles recommandées par l'OMS (WHO 2005, 2021).

1.1. Classification des particules atmosphériques

Les particules atmosphériques sont un mélange de particules solides et liquides, composées de substances organiques et inorganiques, et d'entités biologiques. Cette composition dépend fortement du lieu de prélèvement des particules, de leurs sources et de leur taille (Cheung *et al.* 2011 ; Park *et al.* 2018 ; Plummer *et al.* 2012 ; Tsai *et al.* 2015). Les particules peuvent être classées selon leur DAE, et une distinction peut être faite entre les particules avec un diamètre inférieur à 10 μm (PM_{10}), 2,5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) aussi appelées particules fines, et 0,1 μm ($\text{PM}_{0.1}$) dénommées particules ultrafines. Une distinction peut aussi être faite selon le mode de formation des particules. Ainsi les aérosols primaires sont des particules émises dans l'atmosphère depuis une source naturelle ou anthropique, sans subir de modifications physiques et/ou chimiques durant leur séjour dans l'atmosphère (caractéristiques de ces PM identiques depuis leur émission jusqu'à leur échantillonnage). Les aérosols secondaires se forment dans l'atmosphère après transformation d'une particule primaire ou par conversion gaz-particule avec des composés divers tels que les oxydes de soufre ou d'azote.

1.2. Origine des particules fines

Les caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques ont été largement étudiées. Diverses sources naturelles sont responsables des émissions de $\text{PM}_{2.5}$ tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des sols, les embruns marins et les feux de forêts. À tout cela s'ajoute la source biologique (pollen, spores, bactéries, champignons, virus) (Adhikari 2020 ; Gualtieri *et al.* 2017) (Figure 1).

Chapitre 1

État de l'art

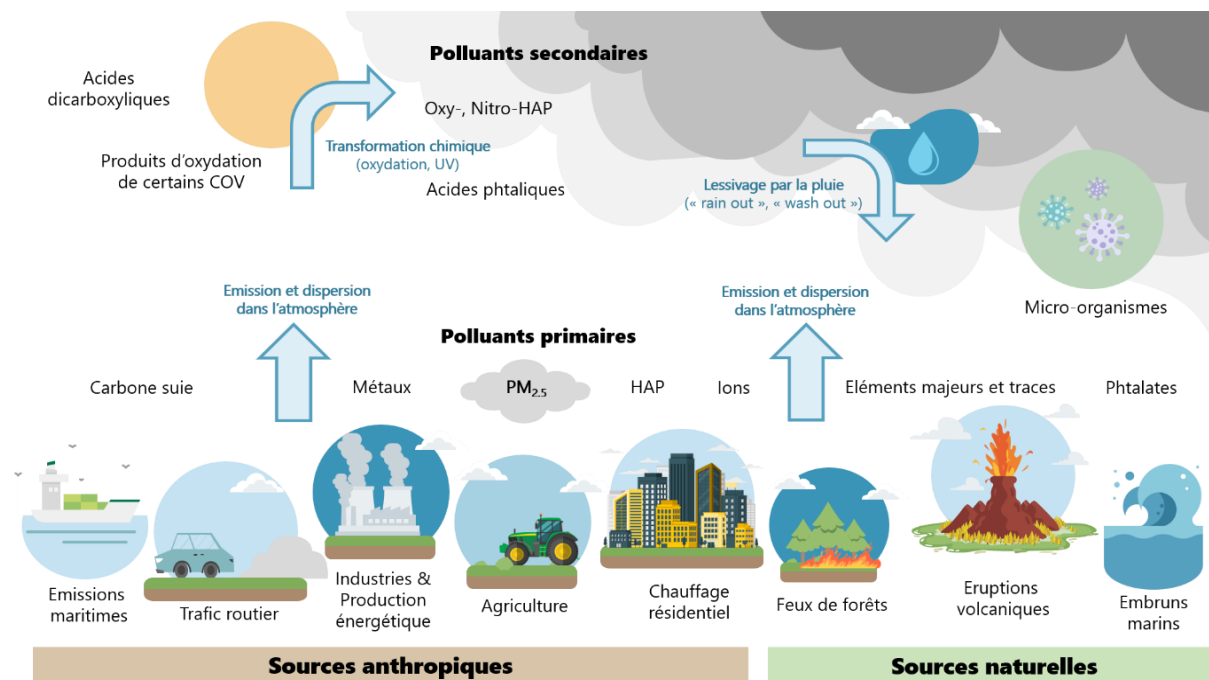


Figure 1 : Sources des PM_{2,5} et composés primaires et secondaires formés. (HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, COV : composés organiques volatils)

Tableau 1 : Estimation de l'apport des émissions mondiales des particules atmosphériques selon les sources (d'après (Delmas *et al.* 2007))

Origines	Sources	Flux (Mt.an ⁻¹)	
		Estimation moyenne	Estimations Min. et Max.
Naturelles	Poussière Crustales	1500	1000 - 3000
	Sels marins	1300	1000 - 10000
	Débris végétaux	50	26 - 80
	Cendres volcaniques	30	4 - 10000
	Sulfates biogéniques	90	80 - 150
	Sulfates volcaniques	12	5 - 60
	Aérosols organiques secondaires	55	40 - 200
	Nitrates	22	15 - 50
	Total	3059	2170 - 23540
Anthropiques	Suies	20	5 - 20
	Poussières industrielles	100	40 - 130
	Feux de végétations	80	60 - 160
	Sulfates anthropiques	140	170 - 250
	Nitrates anthropiques	36	26 - 65
	Aérosols organiques	10	0,5 - 25
	Total	386	301,5 - 650

À l'échelle mondiale, les sources naturelles prédominent sur les émetteurs anthropiques (Delmas *et al.* 2007). Les émissions naturelles représentent environ 89 % des émissions totales et donc seulement 11 % des émissions sont d'origines anthropiques (Tableau 1). Toutefois, à une échelle locale, les apports anthropiques peuvent dépasser les apports naturels, en particulier dans les zones les plus polluées (Kuniyal et Guleria 2019). Une

attention particulière est portée sur les particules atmosphériques d'origine anthropique, car elles ont un lien direct avec les changements climatiques, la perturbation des cycles et les impacts sur la santé. Les émetteurs principaux sont l'industrie (la pétrochimie, la métallurgie, etc.), la production d'énergie, le trafic routier, l'agriculture et la sylviculture (Seinfeld et Pandis 2006).

1.3. Composition chimique des particules

La taille et la composition des PM sont liées à leur origine et peuvent être impactées par la photochimie atmosphérique et les conditions météorologiques (Landkocz *et al.* 2017). Les particules les plus grosses comme les PM₁₀, proviennent principalement de processus mécaniques et physiques comme l'abrasion ou l'érosion, tandis que les fractions les plus fines proviennent de manière prédominante d'activités anthropiques. De manière spécifique, les PM_{2.5} et PM_{0.1} concentrent les composés les plus toxiques (Gualtieri *et al.* 2017).

Les particules sont composées de fractions carbonée, inorganique et organique. Dans la première se trouve le carbone élémentaire (EC ou noir de carbone) et le carbone inorganique (carbonates par exemple). La fraction inorganique rassemble les ions et les éléments traces et majeurs, dont les métaux. La fraction organique inclue les éléments biologiques tels que les plantes et les micro-organismes, mais aussi des composés organiques comme les HAP, les n-alcanes, les dioxines, les furanes et les quinones. Certains composés comme les perturbateurs endocriniens tels que les phtalates ou les bisphénols (Fu et Kawamura 2010 ; Lee *et al.* 2017 ; Ma *et al.* 2014 ; Rakkestad *et al.* 2007), ainsi que la fraction biologique (Fadel *et al.* 2021 ; Gao *et al.* 2015) ont été très peu étudiés jusqu'à aujourd'hui. Il est signalé dans plusieurs études que, selon la composition des particules et la saison où elles ont été prélevées, la toxicité varie (Plummer *et al.* 2012 ; Rönkkö *et al.* 2018).

1.3.1. La fraction carbonée

De manière plus approfondie, la fraction carbonée se trouve sous plusieurs formes dans les PM_{2.5}. La forme carbone élémentaire (EC) est issue des processus de combustion, que l'on peut appeler carbone suie ou noir de carbone. Cet EC constitue le squelette carboné d'aérosols de combustion sur lequel d'autres éléments et molécules vont pouvoir s'adsorber. La forme carbone organique (OC) rassemble l'ensemble des composés organiques et les entités biologiques. Ainsi, les origines de ces formes carbonées peuvent être naturelles, avec notamment les origines biologiques (végétation, spores fongiques, espèces marines) mais aussi anthropiques (Fadel *et al.* 2021 ; Gao *et al.* 2015). Les processus de combustion émettent des polluants primaires d'EC et d'OC dans des proportions différentes selon le

Chapitre 1

État de l'art

régime de combustion et la nature du combustible (bois, charbon, essence, gazole, fioul lourd). Ainsi le rapport OC/EC permet de relier les émissions à certaines origines (Hitzenberger *et al.* 2006). Des composés secondaires formés dans l'atmosphère par conversion chimique ou physique peuvent intégrer cette fraction carbonée. On y retrouve notamment les produits d'oxydation des composés organiques volatils et des acides dicarboxyliques (Figure 1).

1.3.2. La fraction inorganique

La fraction inorganique regroupe les ions hydrosolubles et les éléments majeurs et traces. Les espèces les plus abondantes sont les anions chlorures Cl^- , nitrates NO_3^- , sulfates SO_4^{2-} , et les cations sodium Na^+ , potassium K^+ , ammonium NH_4^+ , calcium Ca^{2+} et magnésium Mg^{2+} . L'origine de ces particules est principalement naturelle (marine et crustale), mais aussi anthropique primaire (engrais, matières premières riches en sels, etc.). Certaines de ces molécules, NO_3^- , SO_4^{2-} et NH_4^+ sont caractéristiques de la formation d'aérosols secondaires.

Les sels marins sont mis en suspension dans l'air par l'action du vent, des vagues et du pétilllement marin. La présence de ces sels peut permettre de révéler l'influence marine de l'échantillon prélevé. Un sel marin fraîchement émis a la composition de l'eau de mer. Lorsque celui-ci séjourne dans l'atmosphère, des réactions avec des composés gazeux acides, tels les NO_x ou SO_2 peuvent se produire. Ces réactions aboutissent à la perte de chlore. Le ratio Cl/Na est couramment utilisé pour distinguer un sel marin frais (rapport massique $\text{Cl}/\text{Na} = 1,79$, dans l'eau de mer) d'un sel marin âgé ou anthropisé ; dans ce cas, le ratio Cl/Na voit sa valeur diminuer (Seinfeld et Pandis 2006).

Les éléments majeurs et traces peuvent avoir des origines à la fois naturelles et anthropiques. Les éléments issus de l'érosion des sols sont ceux que l'on retrouve naturellement au niveau de la croûte terrestre, principalement sous la forme d'aluminosilicates (Al, Ca, Si, Mg, Fe, Ti, K...). Ceux associés aux sels marins sont identiques aux espèces majoritaires présentes dans l'eau de mer (Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , Mg^{2+} ...). Les éléments d'origine anthropique peuvent provenir des émissions du trafic routier comme l'usure des freins (Cu, Sb, Fe) ou des pneus (Zn) (Gietl *et al.* 2010 ; Puisney *et al.* 2018), mais aussi les huiles moteurs (Ba) et la remise en suspension de poussière (Al, Mg) (Monaci et Bargagli 1997). L'industrie, et notamment la métallurgie, est un émetteur d'éléments majeurs et traces tels que Fe, Ca, Mn, Cu, Zn et Al, de part les matières premières utilisées ou les rejets (Kfoury *et al.* 2016). Notons que le même élément peut provenir à la fois de sources naturelles et anthropiques, ce qui peut compliquer l'identification précise de son origine.

D'autres procédés anthropiques peuvent entraîner l'émission de certains éléments comme la combustion du charbon (Al, Co, Cr, Cu, As, et Se), l'incinération des déchets (K, Cd, Cu, Pb, Sb, Zn, et Hg) ou, la combustion de fioul lourd ou le raffinage (La, Ni et V) (Fadel 2021).

Ces éléments peuvent jouer un rôle majeur dans la toxicité des particules.

1.3.3. La fraction organique

La fraction organique est constituée de différentes familles de composés. Parmi celles-ci, on retrouve les alcanes qui ont pour origine des émissions véhiculaires, industrielles et biogéniques. Les alcanes les plus légers peuvent se retrouver sous forme gazeuse, mais les plus lourds d'entre eux sont présents sous forme particulaire (Fadel 2021).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés formés de plusieurs noyaux benzéniques, et sont connus pour leurs toxicités. 16 d'entre eux sont reconnus comme polluants prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA). L'origine de ces HAP est largement anthropique, la plupart provenant des échappements de véhicules, de la combustion de gaz, du chauffage résidentiel, de l'incinération, des fumées, et des procédés industriels. Les causes naturelles, comme les éruptions volcaniques et des feux de forêts, peuvent également être à l'origine des émissions de HAP. Des composés organiques secondaires peuvent être formés à partir des HAP pour former notamment des oxy-HAP et des nitro-HAP.

D'autres composés organiques comme les hopanes sont des hydrocarbures pentacycliques que l'on peut retrouver dans les lubrifiants automobiles. Ils sont donc des marqueurs du trafic routier.

Les phtalates sont des composés fabriqués par l'Homme, utilisés comme additifs dans la fabrication de matériaux plastiques, permettant d'améliorer leur souplesse. Ils sont liés par des liaisons intramoléculaires faibles, ce qui facilite leur détachement (Mitrano *et al.* 2021). Ces composés se retrouvent principalement dans les zones d'incinération de déchets. Il sont reconnus comme étant des perturbateurs endocriniens depuis plus de 10 ans (Habert *et al.* 2009).

Les dioxines (polychlorodibenzo-p-dioxines ou PCDD), furanes (polychloro dibenzofuranes ou PCDF) et polychlorobiphényles (PCB) sont de grandes familles de composés chlorés semi-volatils persistants dans l'environnement. Les PCDD et PCDF sont produits le plus souvent par les émissions véhiculaires et les procédés industriels, mais aussi par l'incinération de déchets à très haute température. Les PCB ne sont pas des substances naturelles. Ces composés ont la propriété d'être des isolants électriques et ininflammables. Ils ont ainsi été utilisés de manière massive dans les transformateurs électriques, avant que l'on

Chapitre 1

État de l'art

découvre leur toxicité élevée. Ils sont aujourd'hui interdits à la production et à l'utilisation, mais demeurent de manière persistante dans l'environnement (Bruckmann *et al.* 2013 ; Colombo *et al.* 2013). Ces familles de composés sont très connues pour leur toxicité, notamment pour leur liaison au récepteur Aryl hydrocarbon (AhR)(Mimura et Fujii-Kuriyama 2003).

1.4. Situation locale des PM_{2.5} dans la région Hauts-de-France

La région HdF est située le plus au nord de la France métropolitaine. Elle est frontalière avec la Belgique et est bordée par la Manche et la mer du Nord. Près de 70 % de la superficie de la région est sous l'influence des grandes aires urbaines (INSEE 2015), ce qui en fait la deuxième région française à influence urbaine après l'Île-de-France. Ces zones urbaines sont propices à la formation de particules fines avec le chauffage résidentiel, le trafic routier incluant les émissions d'échappement et celles hors échappement (usure des freins et des pneus, etc., huiles moteurs et remise en suspension des poussières), et les aérosols secondaires naturels et anthropiques.

La région se situe face au détroit du Pas-de-Calais, voie maritime largement fréquentée par les navires et porte-containers. Ce passage entre l'Atlantique et la mer du Nord est en effet l'un des espaces maritimes les plus fréquentés au monde. C'est une route stratégique liant les villes d'Europe du Nord à l'Asie et l'Amérique. Les plus grandes villes portuaires européennes entourent cette zone avec entre autres Rotterdam, Amsterdam, Anvers, Londres, et les villes françaises de Dunkerque et Calais. Le port de Dunkerque est le troisième plus grand port de France pour le transport de marchandises. Le port de Calais est le premier port français pour le transport de personnes et deuxième européen pour le transport de marchandises par engins roulant. À ces deux ports s'ajoute le port de Boulogne-sur-Mer qui est le premier port de pêche français (INSEE 2017a). Cette voie maritime importante est empruntée par des bateaux provenant du monde entier, capables d'émettre des particules fines. Atmo Hauts-de-France, organisme de surveillance de la qualité de l'air régional, estime que les émissions canalisées en sortie de cheminées des bateaux dans les 3 principaux ports précités, représentent 2 700 tonnes sur l'année 2017 (Atmo Hauts-de-France 2019). Il est possible de voir l'intensité du trafic maritime en Manche-Mer du Nord, et donc l'intensité des émissions de PM_{2.5} dans cet espace, sur la carte de l'Agence Européenne de l'Environnement, en particulier au niveau du détroit du Pas-de-Calais (European Environment Agency. et European Maritime Safety Agency. 2021) (Figure 2).

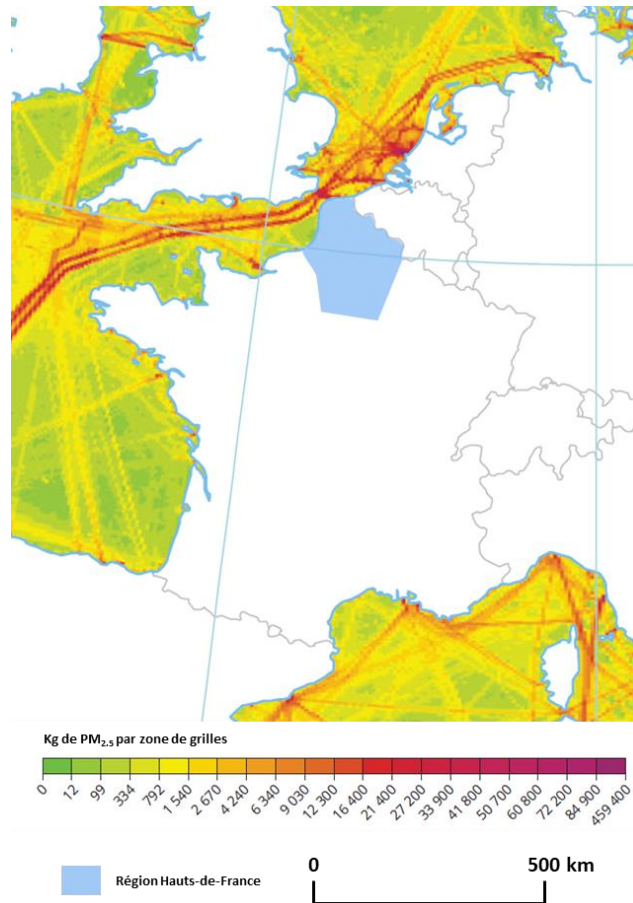


Figure 2 : Émissions de PM_{2,5} provenant du trafic maritime dans les eaux territoriales de France métropolitaine (adapté de *Environmental aspects of maritime transport*, European Environment Agency. and European Maritime Safety Agency., 2021).

La région dispose également d'un réseau d'infrastructures routières et ferroviaires dense pour accompagner ces équipements portuaires. Le réseau routier est particulièrement important autour de la métropole de Lille. Il se dirige en direction de Paris et Lens par l'autoroute A1 ; également en direction de Roubaix et de la Belgique ; et en direction de Dunkerque l'Angleterre et la Belgique par l'autoroute A16. Ce réseau routier voit en moyenne journalière plus de 100 000 véhicules par jour (véhicules légers et poids lourds confondus) (DREAL Hauts-de-France 2021). Les émissions particulières associées au trafic routier ont été estimées à 6 200 tonnes par an, selon Atmo en 2017 (Atmo Hauts-de-France 2019). En comparaison, 186 tonnes de PM_{2,5} sont issues du trafic ferroviaire sur l'année 2017 (Atmo Hauts-de-France 2019).

De plus, cette région est connue pour ses activités industrielles et agricoles. Ces deux secteurs sont particulièrement émetteurs de particules atmosphériques.

Chapitre 1

État de l'art

Pour le secteur industriel, la région accueille un nombre important d'industries diverses et variées, notamment de la métallurgie, de la sidérurgie, la fabrication et l'extraction de produits minéraux. D'autres secteurs sont représentés tels que l'agroalimentaire, l'automobile et la pharmaceutique avec une implantation importante de ces industries. Les sites industriels ont l'obligation de déclarer leurs rejets. On peut retrouver ces valeurs dans le Registre européen des rejets et transferts de polluants (E-PRTR). Toutefois, une partie des émissions industrielles n'est pas soumise à déclaration car difficilement quantifiables, comme les poussières remises en suspension lors de la réception des minerais ou leur manipulation (émissions diffuses). Dans la région, les 5 plus gros émetteurs de particules, avec 4 000 tonnes rejetées par an, représentent 81 % des rejets industriels. Le plus gros émetteur de la région (Figure 3) se trouve dans le Dunkerquois, comme 3 des 5 industries les plus émettrices de la région. Il s'agit d'une aciérie intégrée, c'est-à-dire une usine capable d'effectuer des procédés de métallurgie primaire (transformation du minerai en aggloméré et du charbon en coke puis fonte de l'acier), des procédés secondaires (formation d'alliages) et des coulées afin d'obtenir des lingots ou des tôles. Le Dunkerquois est très industrialisé, on peut y retrouver 16 sites SEVESO (DREAL Hauts-de-France 2020).

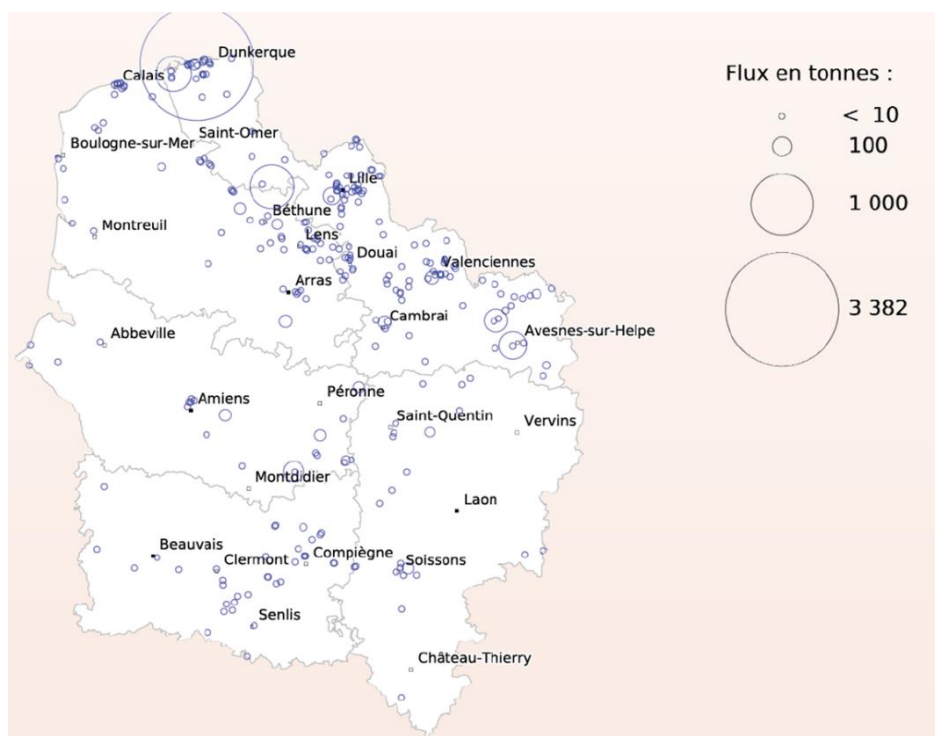


Figure 3 : Inventaire des rejets canalisés de poussière des sites industriels de la région Hauts-de-France en 2017 (Bilan d'activité annuel 2018, DREAL Hauts-de-France, 2019)

Le secteur agricole est important dans la région, avec une forte production de pommes de terre, de lait, de céréales et de sucre à partir de betteraves. Ces activités émettent

premièrement des particules lors de l'utilisation des engins agricoles (remise en suspension de particules du sol) ou lors de la transformation des produits agricoles, avec plus particulièrement deux entreprises d'agro-transformation qui génèrent plus de 500 tonnes de poussières par an (DREAL Hauts-de-France 2020).

2. Interaction des PM_{2.5} avec les voies respiratoires

L'interaction des PM_{2.5} avec les voies respiratoires peut avoir lieu à différents niveaux, du nez jusqu'aux alvéoles, selon les caractéristiques des particules telles que la taille, la forme et l'hygroscopicité, et la géométrie des voies respiratoires. Les voies respiratoires sont organisées en 3 sous-sections : la région extra-thoracique (nez, bouche, pharynx et larynx), la région trachéobronchique (trachée, bronches et bronchioles) et la région alvéolaire (bronchioles terminales, bronchioles respiratoires, conduits alvéolaires et alvéoles) (Figure 4). La déposition des particules sera différente selon la voie d'entrée. En effet, le nez peut agir comme un filtre plus efficace pour les plus grosses particules, par rapport à la bouche (Hofmann 2011). Une fois à l'intérieur des voies respiratoires, 3 mécanismes de dépôt des particules peuvent avoir lieu : (i) l'impaction générée par l'inertie, (ii) la sédimentation causée par la force de gravité, (iii) les mouvements browniens qui gouvernent la diffusion dans le poumon (Ahookhosh *et al.* 2020 ; Gualtieri *et al.* 2017 ; Hofmann 2011 ; Kodros *et al.* 2018).

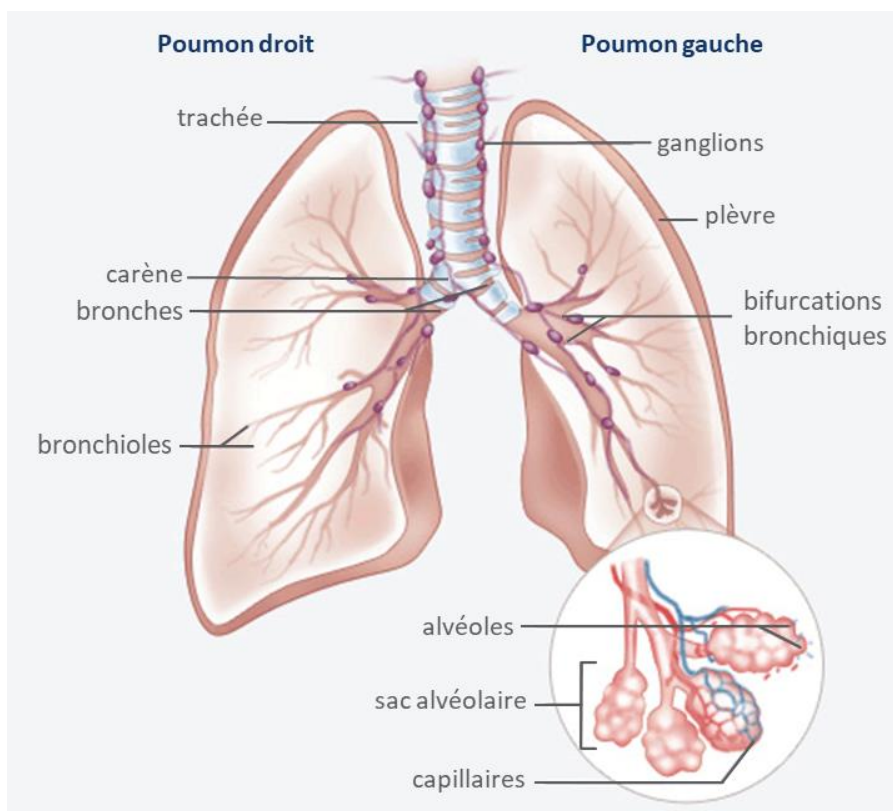


Figure 4 : Schéma des régions trachéobronchique et alvéolaire (adapté de la ligue contre le cancer)

Chapitre 1

État de l'art

Plusieurs études ont montré l'intérêt de la modélisation de la circulation des PM_{2.5} dans les voies aériennes, notamment l'importance de distinguer les différents composés chimiques des aérosols (Ching et Kajino 2018) mais aussi de différencier les tissus touchés (Heyder 2004). En effet, quand la paroi épithéliale est endommagée, comme dans une maladie inflammatoire chronique, le dépôt de particules est plus important à l'endroit de la lésion (Farghadan *et al.* 2020). Les particules les plus fines ont tendance à occasionner le plus de dommages (Kelly et Fussell 2012), en particulier les fractions fines et ultrafines qui ont un rapport surface/masse plus élevé, maximisant leur impact sur les voies respiratoires (Gualtieri *et al.* 2017). Les particules les plus fines vont atteindre les alvéoles pulmonaires les plus profondes et diffuser à travers les membranes cellulaires pour atteindre la circulation sanguine à l'état particulaire, ou après solubilisation et/ou métabolisation des composants des particules (Darquenne 2012 ; Heyder 2004 ; Hofmann 2011). Il est aujourd'hui admis que les PM_{2.5} peuvent être retenues dans le parenchyme pulmonaire et intégrer la circulation sanguine (Sakai *et al.* 2004). Le dépôt et l'accumulation des particules peuvent se produire plus spécifiquement au niveau de la carène (la bifurcation au niveau de la trachée) et des bifurcations bronchiques et alvéolaires (Figure 4). L'accumulation de particules est due à l'impact inertiel et à une diminution de l'efficacité de clairance (Martonen *et al.*, 1994). Ce phénomène pourrait expliquer le nombre croissant de carcinomes dans les voies aériennes supérieures (Balásházy *et al.*, 2003; Martonen, 1992).

3. Impact des PM_{2.5} sur la santé humaine

L'exposition à des pics de pollution de PM_{2.5} a été associée à une augmentation significative du nombre de visites aux urgences pour de l'asthme, des sifflements respiratoires, des bronchites, des symptômes des voies respiratoires inférieures et des allergies (D'Amato *et al.*, 2010; Tsai & Yang, 2014). Cette exposition est également liée à une surmortalité (Chen *et al.* 2019 ; Cohen *et al.* 2017 ; Lepeule *et al.* 2012), particulièrement dans les zones les plus polluées (Song *et al.* 2017). L'OMS a estimé que les PM_{2.5} étaient responsables de 4,2 millions de morts prématurées à travers le monde en 2016, parmi lesquelles 58 % étaient dues à des cardiopathies ischémiques, 18 % à des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et 6 % à des cancers du poumon (WHO 2018). Ces maladies pulmonaires préexistantes ont pu être exacerbées par l'exposition aux PM_{2.5} (Andersen *et al.* 2012 ; Anenberg *et al.* 2018 ; Castañeda *et al.* 2017 ; Shengguang Chen *et al.* 2017 ; Fan *et al.* 2016 ; Metzger *et al.* 2004 ; Peel *et al.* 2005).

Une large étude épidémiologique sur une cohorte de plus de 60 millions de personnes aux Etats-Unis, de 2000 à 2012, a montré la corrélation entre la concentration en PM_{2.5} et la

mortalité, même à des concentrations en deçà de $5 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (Di *et al.* 2017), qui est depuis peu la valeur moyenne annuelle recommandée par l'OMS (WHO 2021). En outre, sur la base d'un modèle de chimie atmosphérique prédictif mondial de l'exposition aux particules, Lelieveld *et al.* (2015) ont estimé que la mortalité devrait doubler d'ici 2050, et cela malgré la limitation des émissions anthropiques aux valeurs actuelles et selon les lignes directrices futures. Dans un autre travail, ils ont montré que si les émissions de pollution atmosphérique anthropique étaient nulles, alors il serait possible d'éviter 25 à 80 % de perte d'espérance de vie (gamme large selon le rôle local des émissions), en considérant que la pollution atmosphérique pourrait conduire à la perte de 2,9 années de vie à la population mondiale, tout âge confondu (Lelieveld *et al.*, 2020). Plusieurs symptômes ont été associés spécifiquement à des composants des $\text{PM}_{2.5}$ (Sugiyama *et al.* 2020).

4. Mécanismes de toxicité induits par les $\text{PM}_{2.5}$

L'exposition des cellules pulmonaires aux $\text{PM}_{2.5}$ va entraîner différents mécanismes de réponses. Ces mécanismes vont de la mort cellulaire à la génotoxicité en passant par l'inflammation (Ghio *et al.* 2012 ; Gualtieri *et al.* 2017). D'autres mécanismes sous-jacents peuvent entraîner la mort cellulaire, comme le stress oxydant, ou activer certaines voies spécifiques comme la métabolisation des composés organiques (Figure 5).

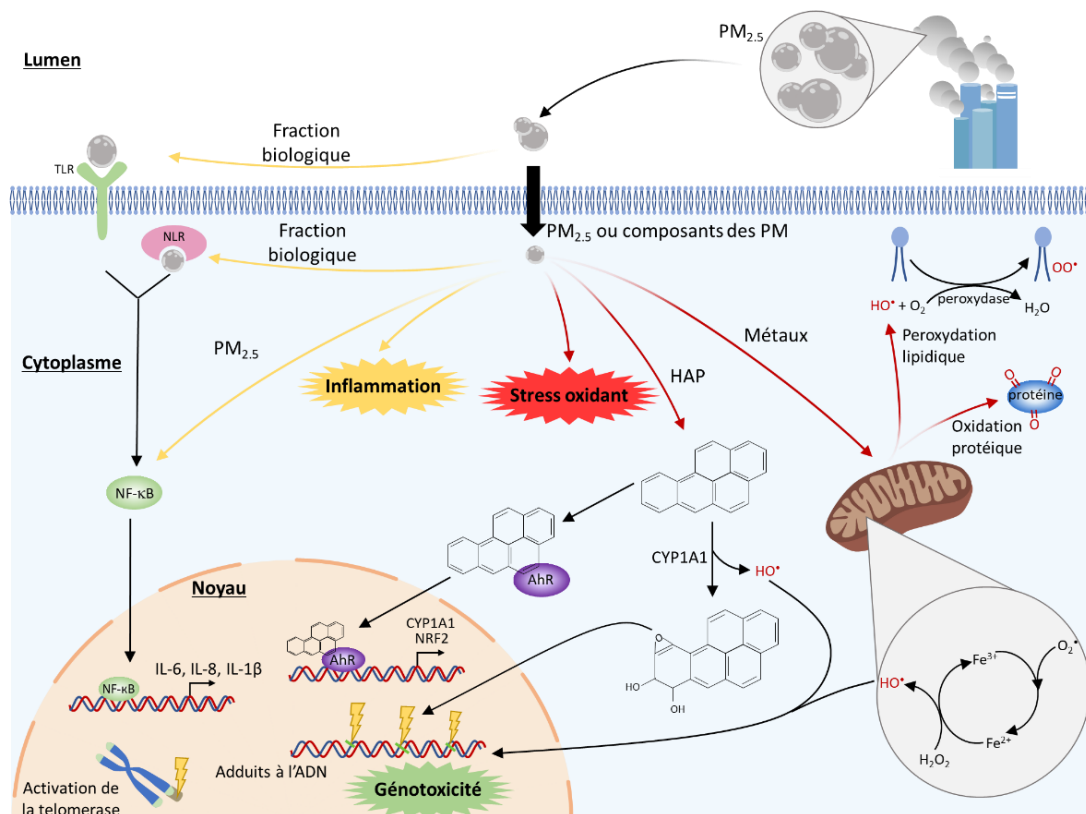


Figure 5: Mécanismes intracellulaires connus de toxicité des particules fines ($\text{PM}_{2.5}$) (Cochard *et al.* 2020)

Chapitre 1

État de l'art

4.1. La mort cellulaire

Il existe plusieurs types de morts cellulaires qui sont définies selon l'aspect morphologique des cellules (apoptose, autophagie, nécrose, entose, etc.), les enzymes impliquées (caspases, calpaïnes, cathepsines, transglutaminases, etc.) et les aspects fonctionnels (programmés ou accidentels, physiologiques ou pathologiques) (Hotchkiss *et al.* 2009 ; Kroemer *et al.* 2009).

L'apoptose est caractérisée comme la mort cellulaire programmée suite à l'activation de signaux pro-apoptotiques. La cellule apoptotique se différencie visuellement par un rétrécissement de la cellule et de son noyau. La chromatine se condense, le noyau se fragmente et des bulles se forment au niveau de la membrane plasmique. La membrane plasmique des cellules apoptotiques reste intacte jusqu'à la fin du processus apoptotique. A l'issue de celui-ci, les cellules sont phagocytées par des cellules immunitaires (Hotchkiss *et al.* 2009 ; Kroemer *et al.* 2009).

L'autophagie est un procédé de recyclage des organelles de la cellule. En effet, la cellule va séquestrer son propre matériel cytoplasmique, soit par une structure double membrane, soit par invagination de la membrane lysosomale, ou soit par des protéines chaperonnes qui vont amener le matériel à l'intérieur du lysosome afin de le recycler (Hotchkiss *et al.* 2009 ; Peixoto *et al.* 2017).

La nécrose se différencie par la rapide chute du potentiel membranaire, ce qui aboutit à la rupture de la membrane plasmique. Cette rupture membranaire peut-être due à un stress osmotique ou mécanique, ou à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Hotchkiss *et al.* 2009).

La ferroptose est un type de mort cellulaire associé à une forte accumulation de fer dans la cellule et une peroxydation lipidique. Cette mort cellulaire est due principalement à une diminution des capacités antioxydantes de la cellule résultant à une accumulation d'ERO (Li *et al.* 2020).

Les PM_{2.5} sont connues pour induire une mort cellulaire sans rupture de la membrane plasmique, en particulier pour les faibles concentrations de particules (Peixoto *et al.* 2017). L'apoptose est un des mécanismes de mort cellulaire connu pour être induit par les PM_{2.5} (Badran, Verdin, *et al.* 2020 ; Gualtieri *et al.* 2011 ; Longhin *et al.* 2013 ; Peixoto *et al.* 2017). L'autophagie est également activée par l'exposition aux PM_{2.5}, notamment par la génération intracellulaire d'ERO (Dornhof *et al.* 2017 ; Wang *et al.* 2021). Toutefois, aucune voie de signalisation n'est actuellement privilégiée pour démontrer l'activation de l'autophagie (Peixoto *et al.* 2017). Très peu d'études ont aujourd'hui mis en relation l'exposition aux PM_{2.5} et la ferroptose. Cependant, deux études ont mis en avant l'induction de la ferroptose après une

exposition aiguë aux $PM_{2.5}$, due à une augmentation importante d'ERO (Gu *et al.* 2023 ; Wang et Tang 2019). La nécrose est très peu étudiée suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$. Elle se produit lors d'exposition à de très fortes concentrations en $PM_{2.5}$ (Peixoto *et al.* 2017).

4.2. La génotoxicité et la mutagénicité

La génotoxicité correspond aux dommages causés au génome par un agent chimique ou physique. Les modifications induites sur le génome peuvent être réversibles ou irréversibles, et aboutir à différents types de lésions capables d'altérer les informations véhiculées par l'ADN. Les différents procédés génotoxiques peuvent être la formation de micronoyaux, les aberrations chromosomiques, les adduits à l'ADN, la modification de certaines bases, les cassures (cassure double brins, cassure simple brin), mais également l'altération du système de réparation de l'ADN.

Plusieurs études ont démontré le potentiel génotoxique des particules (Bocchi *et al.* 2019 ; Çakmak *et al.* 2019 ; Huang *et al.* 2020 ; Oh *et al.* 2011 ; Platel *et al.* 2020). Deux d'entre elles ont montré une réponse génotoxique plus importante pour les $PM_{2.5}$ hivernales (Bocchi *et al.* 2019 ; Çakmak *et al.* 2019), avec notamment une association entre le fer et le cuivre et l'apparition de micronoyaux. Une autre étude a associé l'apparition de génotoxicité et la présence de métaux lourds (Huang *et al.* 2020). Pour d'autres, les extraits organiques de $PM_{2.5}$ induisent de la génotoxicité par la production d'ERO. Les auteurs précisent que leurs extraits contiennent certaines espèces organiques avec des agents potentiellement responsables de ces effets (HAP, dérivés alkyl des HAP, hydrocarbures chlorés aliphatiques, nitro-HAP, cétone et quinones) (Oh *et al.* 2011).

La mutagénicité est un des cas particuliers de la génotoxicité, soit l'incapacité de réparer les lésions à l'ADN, entraînant une modification permanente dans la structure de l'ADN et altérant le génome. L'étude de Landkocz *et al.*, 2017 montre que les extraits organiques de $PM_{2.5}$ sont capables d'induire des mutations géniques suite à l'utilisation du test d'Ames. Les PM non-extraites et la fraction hydrosoluble n'ont pas été capables de créer des mutations. Ces mutations seraient donc dues aux composés organiques comme les HAP, oxy-HAP et nitro-HAP présents dans l'extrait organique. Une autre étude a montré des résultats similaires suite à l'utilisation du test d'Ames et « SOS chromotest » sur des extraits organiques de $PM_{2.5}$ (Melki *et al.* 2017).

Enfin, les particules fines peuvent interférer avec la division cellulaire en altérant la prophase et la métaphase, en augmentant l'induction de micronoyaux, mais aussi en altérant la réparation des cassures doubles brins (Billet *et al.* 2018 ; Longhin *et al.* 2020).

Chapitre 1

État de l'art

4.3. Inflammation

L'inflammation est un processus physiologique à plusieurs étapes. Tout d'abord, les cellules résidentes reconnaissent les agents pathogènes ou une blessure par le biais de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui comprennent des récepteurs membranaires (récepteur de type Toll : TLR) ou cytosoliques (récepteurs de type NOD : NLR). La liaison à ces récepteurs active des voies de signalisation, ce qui peut induire la translocation dans le noyau de facteurs de transcription comme NF- κ B. En conséquence, les facteurs de transcription induisent l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines (interleukines IL-6, IL-1 β et tumor necrosis factor α (TNF α)), les chimiokines (IL-8, CCL2), des enzymes (COX2) et des molécules d'adhérence (VCAM, ICAM-1). Enfin, des médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les cellules induisent une réponse inflammatoire grâce au recrutement de cellules immunitaires (Arooj *et al.* 2020). Afin d'obtenir la résolution de cette réaction, des médiateurs anti-inflammatoires vont être induits par les cellules résidentes. Dans le cas d'une inflammation chronique, le processus pro- et anti-inflammatoire est altéré et empêche la résolution de la réponse inflammatoire. La réponse reste active et peut entraîner des lésions tissulaires et l'inflammation s'auto-entretient. Ce type de dommage entraîne des inflammations chroniques similaires à l'asthme ou à la BPCO.

Après exposition à des PM_{2.5}, les cellules A549, lignée alvéolaire d'adénocarcinome, et les cellules BEAS-2B, des cellules épithéliales bronchiques immortalisées, ont montré une augmentation de l'expression de *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α* et *IL-8* *in vitro* (Dieme *et al.* 2012 ; Michael *et al.* 2013 ; Thomson *et al.* 2015). De nouvelles études mettent en avant l'interaction entre les différents types cellulaires comme les cellules épithéliales et les macrophages (Roh *et al.* 2022 ; Wang *et al.* 2020 ; Yan *et al.* 2017). Ces modèles montrent une activation de la réponse inflammatoire par l'activation d'IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α et MCP-1 au niveau de l'expression génique et de la sécrétion protéique.

L'exposition aux PM_{2.5} entraîne des modifications dans certaines voies de régulation, notamment NF- κ B, MAPK et AP-1 (Líbalová *et al.* 2014). La réponse inflammatoire prédominante après une exposition aux PM_{2.5} serait due aux HAP, métaux, quinones, endotoxines et aux particules elles-mêmes (Gualtieri *et al.* 2017 ; Xu *et al.* 2020). Toutefois, une étude souligne que la composition chimique en elle-même n'est pas suffisante pour prédire l'effet cellulaire, l'interaction et la biodisponibilité des différents composants étant primordiale (Baulig *et al.* 2009).

4.4. Le stress oxydant

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre les ERO et les molécules antioxydantes, en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox, et/ou à des dommages moléculaires et cellulaires. ERO désigne les espèces radicalaires (l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet})) et non-radicalaires (le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), etc.) de l'oxygène. Les ERO sont des molécules instables capables d'initier des réactions d'oxydation (Sies *et al.* 2017).

Ces espèces sont produites naturellement par la cellule lors de réactions mettant en jeu des transferts d'électrons, qui peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. Le système NADPH-oxydase, la respiration mitochondriale et l'activité enzymatique de métabolisation (cytochrome P450, xanthine oxydase, acide arachidonique) sont des sources majeures d'ERO intracellulaires (Figure 6). L'inflammation est également source d'ERO, d'une part par l'activation de macrophages, de neutrophiles et d'éosinophiles, et d'autre part par l'élimination phagocytaire (Figure 6). Des sources physicochimiques externes peuvent entraîner la formation d'ERO tels que les UV, les rayonnements ionisants et les métaux (Figure 6). Le Fe, Cu, Cr, V et Co peuvent subir des réactions redox (réaction de Fenton notamment pour Fe^{2+} et Cu^+), Hg, Cd et Ni peuvent induire l'épuisement du glutathion (GSH) et conduire à la liaison aux groupes sulfhydriles des protéines, l'arsenic pourrait se lier aux thiols (Park *et al.* 2009).

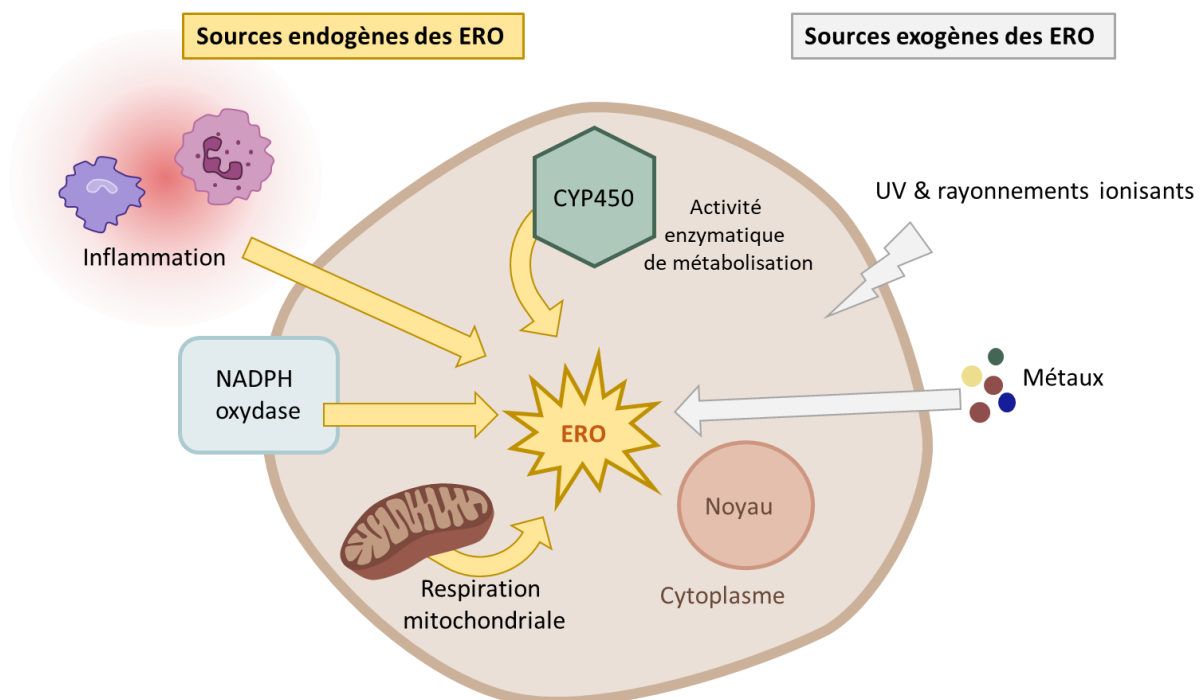


Figure 6 : Origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intra et extracellulaires

Chapitre 1

État de l'art

Afin de maintenir le niveau d'ERO à un niveau non-cytotoxique, un système antioxydant est présent de manière constitutive dans les cellules. L'objectif des espèces antioxydantes est de transformer les ERO en espèces moins cytotoxiques, prévenir ou réparer les lésions induites par les ERO et induire la synthèse de nouveaux antioxydants. Pour cela, des systèmes non-enzymatiques (Figure 7) peuvent être apportés par l'alimentation comme les vitamines C et E, le β -carotène, les oligoéléments et les précurseurs de GSH, ou être d'origine endogène comme les protéines de liaison aux métaux, la mélatonine, l'acide urique, la bilirubine et les polyamines (Mirończuk-Chodakowska *et al.* 2018).

Plus précisément, le GSH est formé par des acides aminés provenant de l'alimentation et par deux enzymes, la glutamate cystéine ligase et la glutathion synthétase (Lu 2013). Deux molécules de la forme réduite du glutathion (GSH) peuvent être oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Figure 7). Cette oxydation peut être accélérée grâce à la présence de l'enzyme glutathion peroxydase et permet ainsi la réduction plus rapide de H_2O_2 en H_2O et O_2 . La glutathion réductase est capable de régénérer GSH à partir de GSSG et NADPH qui permet de donner un électron (Meister et Anderson 1983).

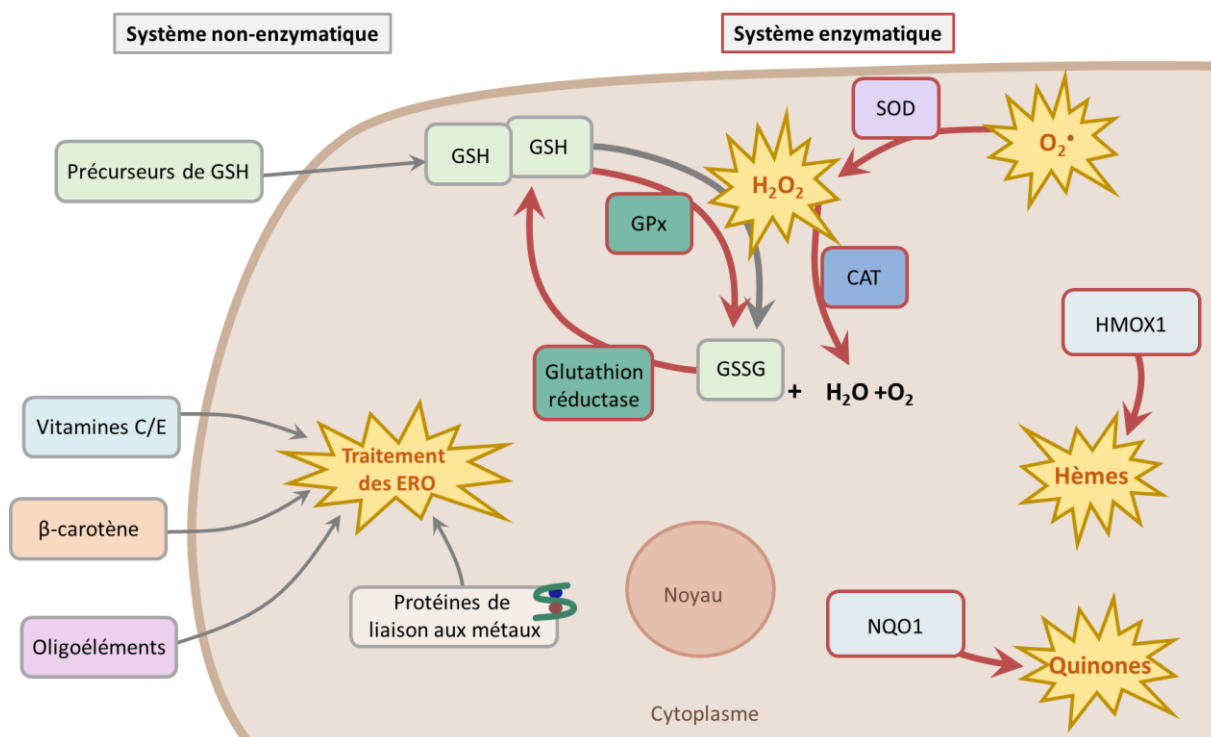


Figure 7 : Mécanismes de défense enzymatique et non-enzymatique contre le stress oxydant.

D'autres systèmes enzymatiques (Figure 7) permettent la diminution d'ERO intracellulaires. La famille des superoxyde dismutase (SOD-1, -2, et -3) est capable de transformer les radicaux O_2^{\cdot} en H_2O_2 . La catalase (CAT) permet de réduire ce H_2O_2 en

$H_2O + O_2$. NQO1 et HMOX1 sont deux autres enzymes, respectivement la NADPH quinone oxydoréductase et l'hème oxygénase, qui sont impliquées dans la réduction des quinones et des hèmes. Ces deux dernières enzymes, NQO1 et HMOX1, sont toutes deux induites par l'activation de Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2), un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse antioxydante, la réponse inflammatoire mais aussi de la réponse métabolique.

La génération d'ERO au-delà des capacités antioxydantes de la cellule va produire un stress oxydant pouvant conduire à l'oxydation des protéines, la peroxydation lipidique et à des dommages à l'ADN (Kelly, 2003). L'oxydation protéique va modifier l'activité des protéines, voire les inactiver. Ces oxydations peuvent être la formation irréversible de protéines carbonylées ou l'oxydation réversible de chaînes latérales des acides aminés, notamment les acides aminés soufrés, basiques et aromatiques (Møller *et al.* 2011). La peroxydation lipidique va entraîner des perturbations de l'organisation membranaire, altérer sa fluidité, sa perméabilité et son intégrité. Les lipides les plus touchés sont les acides gras polyinsaturés (PUFA) et le cholestérol. Cette peroxydation résulte en plusieurs produits, l'hydroperoxyde lipidique et des aldéhydes réactifs. Ces derniers peuvent entraîner la formation de protéines carbonylées (Niki *et al.* 2005). Les dommages à l'ADN sont le plus souvent formés par le radical hydroxyle HO^\cdot , qui va impacter préférentiellement la guanine, donnant comme produit de modification la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG). D'autres lésions plus ou moins importantes peuvent avoir lieu comme des liens inter/intra brins, des cassures, des changements de bases ou des adduits. À la différence des autres macromolécules, si l'ADN est endommagé, il ne peut pas être remplacé et dépend donc des systèmes de réparation (Aust et Eveleigh 1999 ; Lee et Kang 2019).

La présence de $PM_{2.5}$ peut augmenter la production d'ERO et activer les mécanismes de défenses antioxydants de la cellule (Ghio *et al.* 2012). Plusieurs travaux ont mis en évidence que les métaux contenus dans les $PM_{2.5}$ sont de puissants inducteurs de stress oxydant (Ghio *et al.* 2012 ; Gualtieri *et al.* 2017 ; Knaapen *et al.* 2002 ; Samet *et al.* 2019), particulièrement dans la mitochondrie (Visalli *et al.* 2015). Les HAP des $PM_{2.5}$ peuvent également conduire à une surproduction d'ERO (Badran, Ledoux, *et al.* 2020). Plusieurs voies de signalisation sont liées à l'augmentation d'ERO induite par les $PM_{2.5}$, telles que la voie MAP Kinase (MAPK) (Okada *et al.* 2015 ; Taparra *et al.* 2016 ; Valavanidis *et al.* 2013 ; Xu, Ding, *et al.* 2019), nuclear factor- κ B (NF- κ B) (Arooj *et al.* 2020 ; Taparra *et al.* 2016 ; Valavanidis *et al.* 2013), activator protein-1 (AP-1) (Valavanidis *et al.* 2013), et hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) (Taparra *et al.* 2016).

Chapitre 1

État de l'art

4.5. Métabolisation des xénobiotiques

Le processus de métabolisation des xénobiotiques correspond à la biotransformation d'un xénobiotique par des réactions enzymatiques, en un ou plusieurs métabolites. L'objectif de ces transformations est de rendre le xénobiotique hydrosoluble afin de faciliter son excrétion. Toutefois, la métabolisation d'un composé non toxique peut entraîner la formation d'un ou plusieurs métabolites plus réactifs, correspondant à l'activation métabolique.

La métabolisation s'effectue en trois phases, la première étant les réactions de phase I aussi appelées réactions de fonctionnalisation. Cette phase va greffer un groupement polaire sur le xénobiotique grâce aux réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. La famille des monooxygénases à cytochromes P450 (CYP450) sont des enzymes de phase I. Chaque CYP450 va être spécifique de la fonctionnalisation de certains composés ou familles de composés. Ainsi, certains CYP450 vont avoir un intérêt particulier lors de l'exposition de cellules aux PM_{2.5} (Tableau 2). Les PM_{2.5} contiennent un nombre important de composés organiques et notamment des HAP et des dioxines (PCDD), qui peuvent être métabolisés par les CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1. Les perturbateurs endocriniens comme les phtalates sont capables d'activer les CYP2B6 et CYP3A4 (Hukkanen *et al.* 2000, 2002). D'autres enzymes de phase I existent et ne font pas parties de la famille des CYP450, comme l'époxyde hydrolase 1 (EPHX1) qui permet l'hydrolyse d'un époxyde.

Tableau 2 : Activation des cytochromes P450 (CYP450) par les familles de xénobiotiques et récepteurs impliqués.

CYP450	Xénobiotiques métabolisés par les CYP450	Récepteurs activés
CYP1A1	HAP, dioxines, et autres composés organiques	AhR
CYP1A2	HAP, dioxines, et autres composés organiques	AhR
CYP1B1	HAP, dioxines, et autres composés organiques	AhR
CYP2B6	Hormones stéroïdiennes, médicaments, perturbateurs endocriniens	CAR
CYP3A4	Hormones stéroïdiennes, médicaments, perturbateurs endocriniens	PXR, CAR

Les produits de la phase I et autres xénobiotiques possédant des groupes fonctionnels comme le groupement hydroxyle, amine, carboxyle, époxyde ou un atome halogène (F, Cl, Br et I) peuvent subir des réactions de phase II, aussi appelées réactions de conjugaison. Pour cela, différentes enzymes peuvent ajouter des groupements tels que des acides glucuroniques, sulfates ou glutathions. Ainsi, les enzymes sont respectivement l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT), sulfo-transférases et glutathion-S-transférase (GST). La NAD(P)H-quinone oxydoréductase (NQO1) est également une enzyme de phase II qui permet la réduction de quinones en hydroquinones (HQ). Cette réaction va empêcher la formation

d'adduits entre les quinones et les protéines ou l'ADN, faisant de NQO1 une enzyme antioxydante (Ross et Siegel 2018).

A l'issue de ces phases I et II, la phase III, ou phase de transport, va permettre l'excrétion des métabolites *via* des protéines de transports.

Pour induire ces enzymes de phase I et II, il est nécessaire d'activer certains facteurs de transcription. Certains composés organiques sont capables d'activer AhR. Cette protéine cytosolique va se transloquer dans le noyau une fois active. AhR nucléaire va activer l'expression génique des enzymes la métabolisation dans la région promotrice d'un élément de réponse aux xénobiotiques (XRE). Les gènes induits sont ceux des enzymes CYP1A1, CYP1B1, NQO1, AhRR (répresseur d'AhR), GST et UGT (Kawajiri et Fujii-Kuriyama 2007 ; Shivanna *et al.* 2022). D'autres récepteurs comme le Pregnane X receptor (PXR) et le récepteur constitutif des androstanes (CAR) peuvent activer certains CYP450 (Tableau 2) après activation par des molécules tels que les phtalates, le bisphénol A ou certains pesticides (Kretschmer et Baldwin 2005).

Une fois ces enzymes de phase I induites, les enzymes de phase II peuvent être induites à leur tour par certains métabolites électrophiles. Les métabolites électrophiles vont activer l'élément de réponse aux antioxydants (ARE) localisé en amont des gènes des enzymes de phase II. Une communication entre AhR et Nrf2 permet l'activation de ARE également (Hayes *et al.* 2009).

Les PM_{2.5} contiennent des HAP et d'autres espèces organiques capables de conduire à l'activation de la surexpression génique des CYP450 et entrainer une activité enzymatique importante (Badran, Ledoux, *et al.* 2020 ; Billet *et al.* 2018).

5. La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Il existe d'autres mécanismes qui peuvent être induits par l'exposition aux PM_{2.5} qui sont encore peu étudiés. Parmi ces mécanismes, on peut retrouver la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Dysart *et al.* 2014 ; Yang *et al.* 2017).

5.1. Définition de la TEM

La TEM est un processus biologique par lequel des cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales pour tendre vers un phénotype mésenchymateux en passant par des états de transitions (Figure 8). Les cellules épithéliales ont une polarité baso-apicale, ainsi qu'une membrane basale réticulaire du côté basal et le lumen du côté apical. Dans les poumons, la barrière épithéliale est composée de cellules basales, ciliées et caliciformes

Chapitre 1

État de l'art

(Kalluri et Weinberg 2009). Ces cellules interagissent sur leurs côtés latéraux grâce à différents types de jonctions. Du côté apical, les jonctions serrées opèrent comme une barrière contre la lumière pulmonaire, puis les jonctions d'ancrage associent les protéines du cytoplasme et les composants du cytosquelette. Les desmosomes, localisés majoritairement du côté basal, permettent l'ancrage des filaments à la membrane plasmique. Ensuite, les jonctions communicantes permettent le passage de molécules intercellulaires. Enfin, les hémidesmosomes sont des jonctions entre le pôle basal de la cellule et la lame basale réticulaire, liant la kératine cytoplasmique et les composés de la matrice extracellulaire (MEC).

Les cellules-post TEM auront de plus grandes capacités de migration, d'invasion ainsi qu'une augmentation de leur résistance à l'apoptose. De plus, la TEM n'aboutit pas toujours au même produit final, celui-ci va dépendre du programme de TEM suivi. Il est également possible d'obtenir un état de transition, voire une réversion dans le programme et ainsi les cellules peuvent retrouver leur phénotype épithélial d'origine (Yang *et al.* 2020).

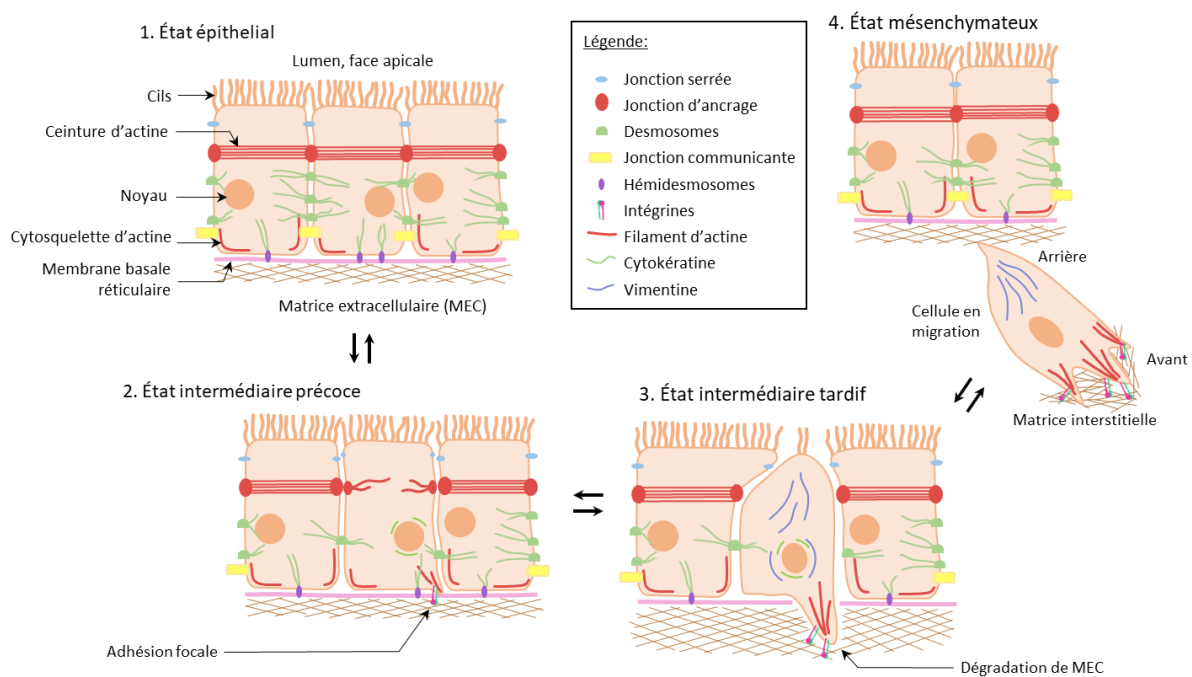


Figure 8 : Évolution du phénotype cellulaire d'une cellule en transition épithélio-mésenchymateuse (Cochard *et al.* 2020)

La TEM est un procédé physiologique et pathologique. Elle a été classée en trois sous-types. La TEM de type 1 est une transition physiologique indispensable au développement de l'embryon, en particulier lors de la gastrulation, la formation de la crête neurale, la décondensation des somites et la formation de la valve cardiaque (Acloque *et al.* 2009). La TEM de type 2 est impliquée dans la régénération de tissus et la cicatrisation. Les cellules

dégradent la lame basale pour ensuite envahir les tissus manquants. Ce type de TEM est associé aux maladies chroniques des voies respiratoires comme la fibrose, l'asthme et la BPCO, qui sont causées par l'accumulation de MEC et une augmentation de l'inflammation (Nieto *et al.* 2016). La TEM de type 3 est associée à une progression du cancer et est considérée comme un mécanisme essentiel pour la dissémination des métastases (Kalluri et Weinberg 2009). Dans chaque type de TEM, des marqueurs différents et spécifiques sont exprimés. Pour ce qui est de la TEM liée à l'exposition aux PM_{2.5}, la TEM de type 1 n'est pas impliquée, tandis que la TEM de type 2 et 3 peuvent l'être car elles sont détectées dans les maladies pulmonaires (Nowrin *et al.* 2014 ; Pain *et al.* 2014).

5.2. Voies de signalisation impliquées dans la TEM

Au cours de la TEM, des changements de régulation dans les nombreuses voies de signalisation complexes et inextricablement connectées se produisent (Ijaz *et al.* 2014 ; Jung *et al.* 2015 ; Lamouille *et al.* 2014 ; Nowrin *et al.* 2014 ; Taparra *et al.* 2016 ; Thiery *et al.* 2009 ; Vu *et al.* 2016), ce qui induit l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription (Figure 9). Ces facteurs de transcription sont les familles de protéines à doigts de zinc SNAI et ZEB, et les protéines hélice-boucle-hélice de la famille Twist (Brabletz *et al.* 2018 ; Lamouille *et al.* 2014 ; Puisieux *et al.* 2014 ; Thiery *et al.* 2009 ; Yang *et al.* 2020). L'expression de ces facteurs de transcription est l'un des marqueurs les plus communs pour l'étude de la TEM (Zeisberg et Neilson 2009) (Figure 9).

L'activation de certains récepteurs transmembranaires peut se faire par des facteurs de croissance comme TGF- β (transforming growth factor β) peut entraîner l'induction de la TEM. TGF- β peut être activé par TNF- α , cytokine pro-inflammatoire. TGF- β possède plusieurs voies d'activation (Figure 9) notamment la voie SMAD avec l'activation de SMAD2/3 et la translocation nucléaire du complexe SMAD2/3-SMAD4 formé (Kolosova *et al.* 2011 ; Valcourt *et al.* 2005). Les voies non-SMAD sont liées aux protéines TRAF6 (TNF receptor-associated 6), SHCA (SRC homology 2 domain-containing transforming A) et PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase). Une fois TRAF6 activé, TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) va phosphoryler des MAP kinase kinase (MKK3/6, MKK4) conduisant à l'activation de deux MAPK, p38 et JNK (JUN N-terminal kinase) (Kolosova *et al.* 2011 ; Yamashita *et al.* 2008). Ces deux voies peuvent entraîner la transcription de *TWIST*. Pour SHCA, une fois activée, elle va entraîner l'association de GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) et SOS (son of sevenless). Cette activation permet de faire le lien entre les voies TGF- β et MAPK.

Chapitre 1

État de l'art

La voie MAPK commence normalement par la liaison du ligand, souvent un facteur de croissance, au récepteur tyrosine kinase. Cette action va activer la petite protéine G : Ras. La cascade de signalisation consiste ensuite en la phosphorylation de chaque kinase, RAF, MEK et ERK (Doehn *et al.* 2009). ERK phosphorylé pourra ensuite transloquer dans le noyau et activer Snail et Slug (respectivement SNAI1 et 2), et ZEB 1 et 2. L'activation du récepteur tyrosine kinase peut également activer PI3K, qui va activer AKT (protéine kinase B). L'activation d'AKT permet l'activation de deux voies sous-jacentes, NF-κB et GSK3β. NF-κB permet la transcription de *TWIST*, *ZEB1*, *SNAI 1* et 2 (Kim *et al.* 2007). Quant à GSK3β, il est inhibé par AKT, ce qui empêche la phosphorylation de la β-caténine cytoplasmique qui est alors stable (Bachelder *et al.* 2005). Celle-ci va être nucléarisée, et grâce à LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) et TCF (T cell factor), *SNAI1/2* et *ZEB1/2* peuvent être transcrits (Nawshad *et al.* 2007). La localisation nucléaire de la β-caténine et de LEF1 est un marqueur courant pour l'étude de la TEM (Zeisberg et Neilson 2009).

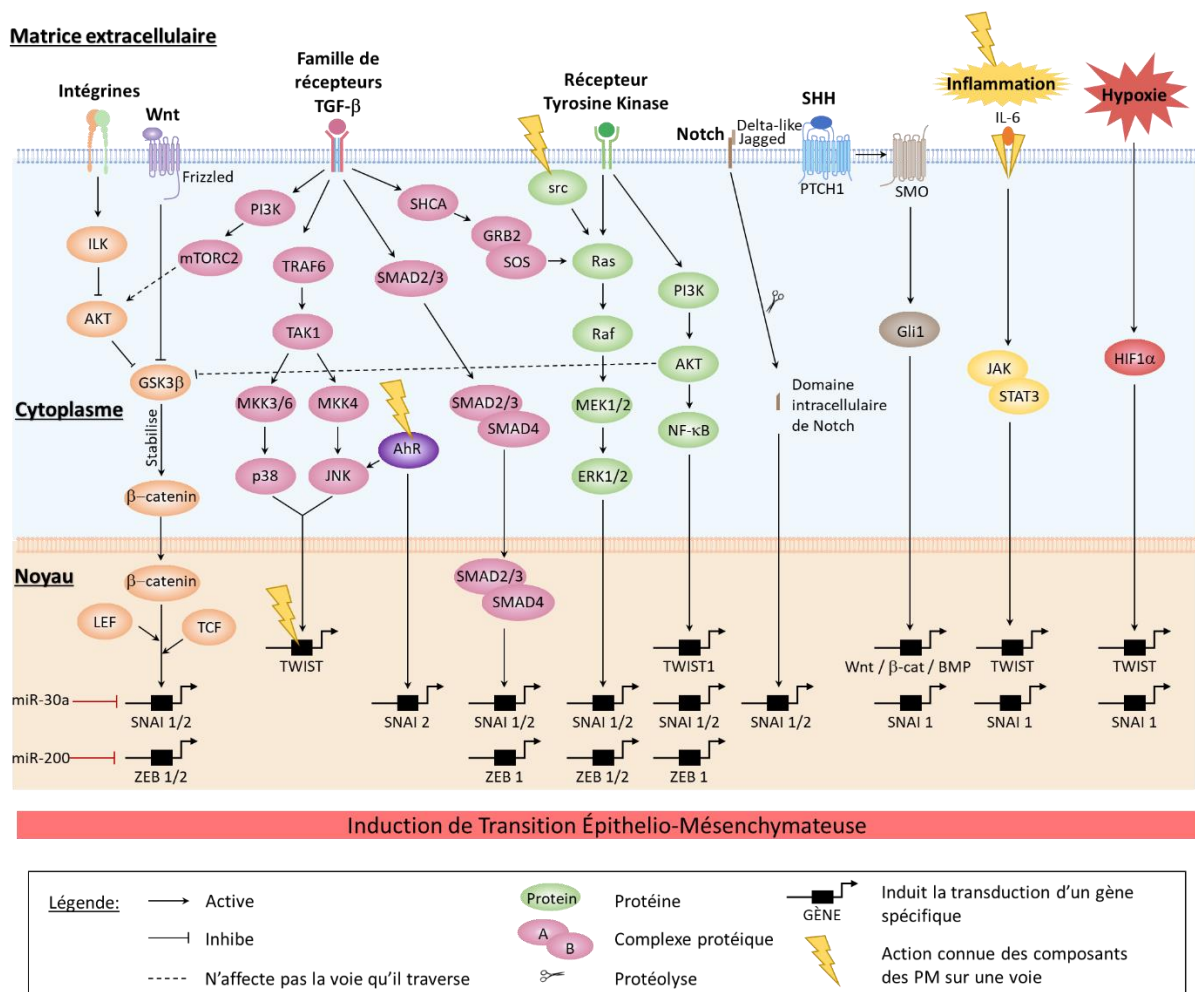


Figure 9 : Cascades de signalisation impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Cochard *et al.* 2020)

PI3K-AKT est une voie retrouvée également après l'activation de TGF- β , par l'intermédiaire de mTORC2 (mammalian TOR complex 2) (Bakin *et al.* 2000 ; Lamouille *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2014). La voie fonctionne de la même façon que pour les récepteurs tyrosine kinase. La liaison de Frizzled à Wnt, ainsi que l'action de ILK (integrin-linked kinase) par l'ancrage des intégrines à la MEC, permettent d'inhiber GSK3 β , et d'activer la voie de TEM.

D'autres voies qui ne s'entrecroisent pas peuvent induire la TEM. La voie Notch peut activer la transcription de *SNAI1* et 2 après la protéolyse du domaine intracellulaire de Notch par la fixation des ligands Delta-like ou jagged (Hori *et al.* 2013 ; Lamouille *et al.* 2014 ; Yuan *et al.* 2014). La voie Sonic Hedgehog (SHH) peut également activer des facteurs de transcription de la TEM. SHH se fixe au récepteur PTCH1 (patched 1), inhibant la répression du récepteur SMO (smoothed), ce qui va activer Gli1 (glioma family transcription receptors 1), notamment pendant le développement et la progression cancéreuse (Briscoe et Thérond 2013 ; Yue *et al.* 2014). Enfin, Gli1 va permettre la transcription de *SNAI1* mais aussi d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de TEM telles que Wnt, β -caténine et BMP (bone morphogenic protein), conduisant à une boucle d'activation.

Lors d'une inflammation, IL-6 peut se lier à son récepteur entraînant une activation du complexe protéique JAK/STAT3 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3). Celui-ci permet la transcription de *TWIST* et *SNAI1* (Sullivan *et al.* 2009 ; Zhao *et al.* 2014).

Quand un tissu est soumis à un manque d'oxygène, comme dans un microenvironnement tumoral, la protéine HIF1 s'active et peut transcrire *TWIST* et *SNAI1* (Yang *et al.* 2008).

Lors de l'exposition aux particules fines, des effets sur les voies de l'inflammation avec IL-6, le récepteur tyrosine kinase src, le récepteur cytoplasmique AhR et la transcription de *TWIST* peuvent être observés (Rico-Leo *et al.*, 2013).

5.3. Marqueurs de TEM, surface, cytosquelette, environnement et génétique

Quand la TEM est initiée, il y a une perte du contact cellule-cellule et un changement dans l'expression des marqueurs de surface (Tableau 3). Les protéines de jonctions épithéliales telles que E-cadhérine et zona occludens (ZO-1) laissent place à des protéines mésenchymateuses comme N-cadhérine, cadhérine-11 ou des intégrines spécifiques α V β 6 et α 5 β 1 (Zeisberg et Neilson 2009).

Chapitre 1

État de l'art

Tableau 3 : Biomarqueurs épithéliaux et mésenchymateux selon le type de TEM

Phénotype épithélial				Phénotype mésenchymateux				
Marqueurs	Spécificités	Type de TEM	Ref	Marqueurs	Spécificités	Type de TEM	Ref	
Marqueurs de surface	E-cadhérine	Jonction d'ancrage	1, 2, 3	a	N-cadhérine	Protéine membranaire	1, 2	
	ZO-1	Jonctions serrées	1, 2, 3	a	Cadhérine 11	Protéine membranaire	3	
	Occludine	Jonctions serrées	2, 3	e, f	Syndécan 1	Protéine membranaire	1, 2, 3	
	Claudine	Jonctions serrées	2, 3	e, f	α V β 6	Intégrine	1, 3	
	Desmoplakine	Desmosomes	2, 3	b	α 5 β 1	Intégrine	1, 3	
	Plakophiline 1-3	Desmosomes	3	b			a	
	Plakoglobine	Desmosomes	3	b, d				
	Desmoglénines 1	Desmosomes	3	b				
	Desmocollines 2-3	Desmosomes	3	b				
	EpcAM	Protéine médiatrice du Ca	3	g				
	MUC1	Mucine sécrétée	2	c				
	Marqueurs du cytosquelette	Cytokératine	Filament intermédiaire	a	Vimentine	Filament intermédiaire	1, 2, 3	a, c
					Desmin	Filament intermédiaire	2, 3	c, k
				α -SMA	Actine	2, 3	a	
				β -caténine	Complexe des jonctions d'ancrage	1, 2, 3	a	
Protéines de la MEC	Collagène IV	Membrane basale	a	S100A4	Protéine de liaison du Ca	1, 2, 3	a	
	Laminine 1	Membrane basale	a	Collagène I	Collagène de cicatrisation	1, 2, 3	a, i	
				Collagène III	Collagène des fibres réticulaires	1, 3	a	
				Fibronectine	Se lie aux intégrines	1, 2	a	
Facteurs de transcription				Laminine 5	Echafaudage pour la migration cellulaire	1, 2	a	
				MMP2	Collagénase	2, 3	j, k	
				MMP9	Collagénase	2, 3	c, j, k	
				SNAIL1 (Snail)	Tous les facteurs modulent les protéines et les voies liées à la TEM	1, 2, 3	a, l	
				SNAI2 (Slug)		1, 2	a, l	
				ZEB1		1, 2, 3	a, l	
				ZEB2		1, 2, 3	a, l	
				Twist 1		1, 2, 3	a, l	
				LEF-1		1, 2, 3	a	
				FOXC2		1, 2, 3	a, k	
			Goosecoid		1, 2, 3	a, k		
miARN	miR-200	Inhibition de la TEM	2	miR-10b	Favorise la TEM	2	a	
			a	miR-21	Favorise la TEM	2, 3	a	

(Références : ^aZeisberg and Neilson, 2009 ; ^bDusek and Attardi, 2011 ; ^cPain *et al.*, 2014 ; ^dChidgey and Dawson, 2007 ; ^eXiao, 2013 ; ^fYlermi, 2012 ; ^gHyun *et al.*, 2016 ; ^hTeng *et al.*, 2012 ; ⁱHosper *et al.*, 2013 ; ^jNawrocki-Raby *et al.*, 2003 ; ^kKalluri and Weinberg, 2009 ; ^lYang *et al.*, 2020)

Dans la TEM de type 2, les cellules épithéliales expriment des marqueurs spécifiques lors de la transition. Ainsi, elles perdent leurs protéines de jonctions intercellulaires E-cadhérine, ZO-1, claudine et occludine. Les cellules prennent une forme fuselée identique à un fibroblaste grâce au réarrangement de l'actine, l'augmentation de l' α -SMA (α -smooth muscle actin) et de la vimentine. Une augmentation de la production des protéines de la MEC est importante, particulièrement pour la TEM de type 2. *In vitro*, les cellules en fin de TEM de type 2 possèdent un phénotype stable dans le temps et à travers les passages après l'arrêt de l'exposition au stimulus de TEM.

Pour la TEM de type 3, le produit final n'est pas un fibroblaste : la transition ici est utilisée pour la mobilité, l'invasion et la métastase. Les cellules obtenues ont des marqueurs plus primitifs similaires aux cellules souches, ainsi que des marqueurs spécifiques du cancer. La TEM de type 3 induit une perte de jonctions épithéliales avec la diminution de E-cadhérine, ZO-1 et des marqueurs des desmosomes. Le cytosquelette est modifié, le niveau de S100A4 augmente et la production de cytokératine diminue. Les cellules acquièrent la capacité de résister aux stimuli apoptotiques (Zeisberg et Neilson 2009).

Dans toutes les études de TEM, le marqueur de surface le plus utilisé est le changement de registre des cadhérines. La cadhérine épithéliale E-cadhérine codée par le gène *CDH1* laisse place à la cadhérine mésenchymateuse N-cadhérine, codée par *CDH2* (Yang *et al.* 2020).

Lorsque les cellules effectuent leur transition, les changements du cytosquelette sont particulièrement marqués (Tableau 3). Les filaments intermédiaires épithéliaux de cytokératine sont remplacés par la vimentine mésenchymateuse (Huang *et al.* 2012 ; Nalluri *et al.* 2015). La dynamique des microtubules est modifiée. Les cellules épithéliales ont un centrosome et des microtubules proches des jonctions cellulaires, tandis que chez les cellules mésenchymateuses, la position est centrale (Margaron *et al.* 2019). Dans les cellules mésenchymateuses, les microfilaments sont réorganisés. La ceinture d'actine disparaît et les fibres de stress d'actine sont réorganisées notamment vers le pôle avant de la cellule pour former des lamellipodes dans la direction de la progression de la cellule, avec une augmentation du niveau de α -SMA. La β -caténine est une protéine qui forme un complexe avec la E-cadhérine lors de l'interaction cellule-cellule chez les cellules épithéliales. Toutefois chez les cellules mésenchymateuses, elle va permettre l'adhérence de la N-cadhérine au cytosquelette, donnant la fonction de motilité aux cellules, notamment au niveau du

Chapitre 1

État de l'art

lamellipode. La N-cadhérine couplée à la β -caténine est très stable dans le temps, et va alors permettre l'ancrage cellule-cellule (Yilmaz et Christofori 2009).

L'environnement cellulaire est également différent selon l'état de la cellule (Tableau 3). Initialement la lame basale des cellules épithéliales est composée de collagène IV et de laminine 1 parmi d'autres protéines. À l'état mésenchymateux final, les cellules sont entourées d'une MEC de fibres réticulaires composées de collagène I et III, de fibronectine et de laminine 5 (Zeisberg et Neilson 2009). Durant la transition, les cellules augmentent leur production en métalloprotéinases matricielles (MMP) 2 et 9 notamment. Elles sont connues pour leur capacité à dégrader la lame basale réticulaire sur laquelle les cellules épithéliales reposent (Kasai *et al.* 2005 ; Polette *et al.* 2004). De plus, les cellules en transition ont tendance à produire des protéines de la MEC mésenchymateuse pour créer leur nouvel environnement.

Les microARN (miR) sont également impliqués dans la régulation de la TEM (Tableau 3), notamment la famille des miR200. Les miR vont cibler l'ARNm et le dégrader ou empêcher sa traduction selon le taux de complémentarité avec la séquence cible. La famille des miR200 cible les facteurs de transcription de la TEM : ZEB1 et ZEB2. D'autres miR sont impliqués dans la TEM tels que miR9 et miR30a, ils ciblent SNAI et ZEB. Certains miR semblent impliqués dans l'invasion et la migration grâce à l'inhibition de certaines protéines : miR10b et miR21 (Zhang et Ma 2012). Une étude récente lie de façon robuste l'implication de miR32 comme inhibiteur de TEM *via* la voie SMAD1, après exposition aux PM_{2.5} (Yang *et al.* 2017).

6. Implication de la TEM dans les maladies pulmonaires

La TEM est connue pour intervenir dans certaines pathologies, notamment dans les poumons. L'asthme, le syndrome de bronchiolite oblitérante, la BPCO, la fibrose pulmonaire idiopathique et la progression du cancer du poumon vers un stade métastatique ont tous été corrélés à la TEM. Parmi ces maladies, l'asthme, la BPCO et les métastases pulmonaires peuvent notamment être liées à l'exposition aux PM_{2.5}.

6.1. La TEM et l'asthme

L'asthme est une inflammation chronique caractérisée par un gonflement des voies aériennes et une sécrétion de mucus supérieure à la normale. Cette maladie touche plus de 300 millions de personnes à travers le monde (WHO 2020). Toutefois, l'inflammation en elle-même n'est pas suffisante pour expliquer le développement de la maladie. Une altération suivie d'une réparation des voies pulmonaires est nécessaire au développement de l'asthme

(Hackett 2012). Chez les patients asthmatiques, la distribution des cellules change, la proportion de cellules caliciformes et basales augmente tandis que la proportion de cellules ciliées diminue. Des observations telles qu'une augmentation de l'épaisseur de la lame basale et des discontinuités dans les jonctions d'ancrage et les jonctions serrées ont été mises en avant (Gohy *et al.* 2016). La TEM joue un rôle dans le remodelage de l'épithélium et plusieurs marqueurs de TEM ont été identifiés dans l'épithélium asthmatique comme la diminution de E-cadhérine, ZO-1 et occludine. Les polypes nasaux peuvent montrer un défaut des mécanismes d'adhérence, et ont aussi été observés chez les enfants atteints (Hackett *et al.* 2009 ; Nawijn *et al.* 2011).

La TEM de type 2 est celle retrouvée chez les asthmatiques chroniques avec des remodelages des voies respiratoires (Ijaz *et al.* 2014 ; Loffredo *et al.* 2017). Une étude de 2018 estime que 16 millions d'enfants sont atteints chaque année d'asthme chronique dû à l'exposition aux PM_{2.5} (Anenberg *et al.* 2018). De plus, pendant les pics de pollution dus aux PM_{2.5}, le nombre de visites aux urgences augmente, spécialement chez les enfants asthmatiques (Fan *et al.* 2016). D'autres données suggèrent que l'asthme ne serait pas uniquement exacerbé par l'exposition aux PM_{2.5} mais initié par cette exposition (Bontinck *et al.* 2020).

6.2. La TEM et la broncho-pneumopathie chronique obstructive

La BPCO est une inflammation long terme des voies respiratoires menant aux alvéoles. La maladie est caractérisée par une augmentation de la sécrétion de mucus et une réduction de la clairance, dues notamment à la destruction de l'épithélium de surface et des cellules ciliées. Le lumen des voies respiratoires les plus fines rétrécit, ainsi les patients deviennent plus vulnérables aux infections car les corps étrangers ne peuvent plus être nettoyés des poumons (Hogg *et al.* 2017). L'évaluation du stade de BPCO se fait en fonction de la gravité de la limitation du débit d'air défini par le comité de Stratégie Mondiale pour le Diagnostic, le Traitement et la Prévention de la BPCO (GOLD 2020). La TEM de type 2 est impliquée dans la BPCO, elle est observable lors de la reconstruction des voies respiratoires et grâce à la mise en évidence de biomarqueurs de ce type de TEM (Gohy *et al.* 2015 ; Sohal *et al.* 2011, 2014). Toutefois, une étude suggère un mélange de TEM de type 2 et 3 chez des patients atteints de BPCO. Des tissus pulmonaires de patients ont montré une augmentation de la vascularisation, de la même façon que dans un environnement tumoral (Jolly *et al.* 2018). Des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux ont été détectés sur la membrane basale et dans des cellules de patients (Sohal *et al.* 2011). De plus, certaines enzymes de dégradation de la MEC telles que MMP2, MMP9, MMP12, ainsi que des protéines de MEC mésenchymateuses, élastine et S100A4, ont été trouvées dans des tissus similaires (Brandsma *et al.* 2020 ; Nowrin

Chapitre 1

État de l'art

et al. 2014). Certaines voies de signalisation ont déjà été identifiées notamment TGF- β et SHH. Elles sont significativement stimulées dans l'induction de TEM et de la BPCO (Belgacemi *et al.* 2020 ; Murray *et al.* 2017 ; Nowrin *et al.* 2014 ; Tam *et al.* 2019). Toutefois, l'étude de tissus de patients qui ont une BPCO a ses limites. En effet, les tissus peuvent maintenir un état mésenchymateux jusqu'à deux semaines, au-delà desquelles les cellules vont revenir à un phénotype épithélial (Gohy *et al.* 2015).

La BPCO est une maladie retrouvée principalement chez les fumeurs (Hylkema *et al.* 2007 ; Laniado-Laborín 2009). Plusieurs études ont examiné le lien entre la fumée de cigarette et le cancer du poumon, la BPCO et la TEM (Hou *et al.* 2019 ; Vu *et al.* 2016). Certains composants de la fumée de cigarette se retrouvent dans les particules atmosphériques et peuvent induire des voies de signalisation similaires. Les PM_{2.5} peuvent être impliquées dans le déclenchement de la BPCO *via* l'inflammation, le stress oxydant et l'altération de l'immunité, ce qui entraîne une plus grande susceptibilité aux infections (Hogg *et al.* 2017 ; Ni *et al.* 2015). La TEM est impliquée dans la BPCO, mais le lien entre les PM_{2.5}, la TEM et la BPCO, n'a pas encore été formellement démontré.

6.3. TEM et progression du cancer du poumon

Le cancer du poumon est le cancer le plus meurtrier, avec 18 % de toutes les morts par cancer à travers le monde (IARC 2020). Il existe 4 types histologiques de cancer du poumon, trois « non à petites cellules » (NSCLC) et un « à petites cellules ». Parmi les trois NSCLC se trouvent l'adénocarcinome, le carcinome squameux et le carcinome à grosses cellules (IARC 2020). La TEM de type 3 est largement connue pour conférer un phénotype invasif et métastatique aux cellules cancéreuses. Cette spécificité repose sur la conversion incomplète ou partielle des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Elles vont ainsi exprimer les deux types de marqueurs et pouvoir ensuite effectuer la transition mésenchymo-épithéliale au niveau du site métastatique (Francart *et al.* 2018). Les cellules qui sont passées par la TEM peuvent acquérir une résistance à l'apoptose et un phénotype de cellule tumorale circulante (Francart *et al.* 2018). Toutes ces capacités permettent la progression du cancer (Kalluri et Weinberg 2009 ; Mittal 2016 ; Nieto *et al.* 2016 ; Thiery *et al.* 2009). De nombreuses voies de TEM sont connues pour être impliquées dans le cancer, parmi lesquelles on retrouve TGF- β (SMAD2/3) ; MAPK, IL-6, Wnt, SHH et Notch (Kalluri et Weinberg 2009 ; Mittal 2016 ; Xiao et He 2010). Toutes ces voies ciblent les facteurs de transcription SNAI et ZEB qui peuvent ensuite avoir un impact direct sur la diminution de l'expression de *CDH1* - E-cadhérine). TWIST, Goosecoid et FOXC2 sont également des facteurs de transcription induits par ces voies et peuvent induire la répression de *CDH1* indirectement (Manshoury *et al.* 2019 ; Xiao et He 2010). Les voies de signalisation de la TEM

amènent à l'inhibition des marqueurs épithéliaux et l'activation des marqueurs mésenchymateux. Les marqueurs les plus utilisés sont la diminution de E-cadhérine et ZO-1, ainsi que l'augmentation de la vimentine, N-cadhérine, fibronectine, α -SMA et les MMP (Polette *et al.* 2004, 2007 ; Xiao et He 2010). Les microARN et principalement la famille miR200, régulent la progression tumorale et la TEM en ciblant ZEB 1 et 2 (Xiao et He 2010 ; Zhang et Ma 2012). L'environnement tumoral influence fortement la TEM. Des facteurs de croissance (EGF, FGF, HGF et TGF- β), des protéases de la MEC (MMP) et des protéines de la MEC (collagène de type 1) peuvent exercer une forte influence sur la progression de la TEM (Jung *et al.* 2015 ; Kalluri et Zeisberg 2006). Les tumeurs dérivant d'exosomes contiennent des inducteurs de TEM qui fournissent des signaux autocrine et paracrine de TEM dans les tumeurs qui s'auto-entretiennent (Syn *et al.* 2016).

Depuis 2013, les particules fines ont été classées comme cancérigène de groupe 1 par le CIRC (Loomis *et al.* 2013). De nombreuses études épidémiologiques ont montré un lien entre l'exposition aux PM_{2.5} et le cancer du poumon (Pope *et al.* 2002 ; Valavanidis *et al.* 2013). Le lien entre les PM_{2.5} et le cancer du poumon pourrait être la TEM cependant, davantage d'études et notamment sur les biomarqueurs sont nécessaires pour explorer cette piste (Santibáñez-Andrade *et al.* 2020).

Les biomarqueurs cliniques sont indispensables pour diagnostiquer des pathologies, particulièrement pour les cancers. Chez les NSCLC, les protéines HIF-1 α , E-cadhérine, Snail, Twist ont été associées à un mauvais pronostic (Mittal 2016). La diminution de E-cadhérine dans les NSCLC a été rapportée dans plusieurs études, toutefois la seule diminution de l'expression de E-cadhérine n'est pas suffisante pour un diagnostic ou pour prédire la TEM (Yang *et al.* 2014). ZO-1 est également trouvée dans le noyau des cellules de patients de NSCLC. Dans l'étude de Lesage *et al.* (2017), les tissus issus des biopsies de 15 des 44 cas de cancers étudiés montrent une augmentation de plus de 10 % de ZO-1 exprimé dans le noyau, ce qui n'est pas suffisant pour considérer ZO-1 comme un biomarqueur fiable. Le dernier marqueur épithélial utilisé en oncologie et pour la TEM est EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). L'étude de EpCAM manque souvent de sensibilité pour la détection des cellules tumorales circulantes, pouvant entraîner une sous-estimation de ces dernières ainsi qu'une erreur médicamenteuse (Milano *et al.* 2018).

Les marqueurs mésenchymateux ont été plus largement étudiés. L'augmentation de l'expression de N-cadhérine a été corrélée à la résistance aux médicaments, plus spécifiquement aux inhibiteurs de EGFR (epidermal growth factor receptor) tyrosine kinase dans les NSCLC (Zhang *et al.* 2013). Néanmoins, la résistance aux médicaments comme une conséquence de la TEM est aujourd'hui remise en question (Yang *et al.* 2020). La

Chapitre 1

État de l'art

cadhérine-11 est exprimée de manière aberrante dans les cellules malignes exprimant un phénotype invasif et métastatique, qui peut entraîner des fibroses (Agarwal 2014). L'expression de la vimentine est largement étudiée et est augmentée de manière significative dans 49 % des patients avec des NSCLC. Elle est associée à un mauvais pronostic de survie (Dauphin *et al.* 2013 ; Tadokoro *et al.* 2016). Une étude combinant l'expression de la vimentine et de PD-L1 (programmed death-ligand 1), un marqueur d'activation et d'inhibition des cellules immunitaires, a permis de mettre en avant les cas les plus avancés et aux pronostics les plus graves (Ancel *et al.* 2019). D'autres marqueurs de surface comme les intégrines mésenchymateuses $\alpha V\beta 6$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ sont surexprimées chez les patients NSCLC et ressortent comme des possibles biomarqueurs cliniques (Agarwal 2014 ; Aksorn et Chanvorachote 2019).

Le facteur de transcription Snail (issu du gène SNAI1) est surexprimé dans 22 % des cas de tumeurs pulmonaires étudiées. De plus, sa présence varie selon le type de cancer (Merikallio *et al.* 2012). Slug (issu du gène SNAI2) et Twist ont été corrélés à un faible pronostic de survie (Jiang *et al.* 2012).

Ainsi, il est indispensable d'utiliser plusieurs marqueurs épithéliaux et mésenchymateux afin d'obtenir une interprétation robuste. Considérer un unique marqueur n'est pas suffisant pour conclure sur la TEM, le diagnostic et le pronostic de la maladie associée.

7. La TEM induite par les PM_{2.5}, études *in vitro*

7.1. Vue globale des études disponibles

La TEM a été découverte par Elizabeth Hay dans les années 1980 (Hay 2005). Un intérêt croissant est porté pour la TEM depuis les 20 dernières années, avec une accélération au cours des 5 dernières années avec plus de la moitié des publications ayant pour sujet la TEM publiées sur cette période (Yang *et al.* 2020). Parmi celles-ci, seules quelques études se sont concentrées sur l'effet des particules fines sur la TEM, sur des cellules pulmonaires *in vitro* (Tableau 4). Les études disponibles utilisent des modèles variés incluant des cellules épithéliales bronchiques immortalisées (BEAS-2B, 16HBE, HBEC et HBEC3), un carcinome alvéolaire (A549) et d'autres carcinomes pulmonaires (H292 et NCI-H441). Deux études ont utilisé des cellules primaires et une lignée alvéolaire de type 2 issu de rats (A11 et RLE-6TN respectivement) (Barker *et al.* 2014 ; Dysart *et al.* 2014).

7.1.1. Sources et origines des PM_{2.5}

Dans les travaux disponibles, les cellules ont été exposées à des PM_{2.5} collectées sous différentes influences comme le trafic routier ou les émissions urbaines. Certaines études concernent des sources d'émission bien définies comme la combustion de biomasse ou de carburant diesel. Trois études ont fait le choix de prendre des échantillons de référence du National Institute of Standards and Technology (NIST), des « particules issues de la combustion de diesel » et des « particules atmosphériques urbaines » (NIST SRM 2975 et SRM 1648a respectivement) (Fu *et al.* 2019 ; Lee *et al.* 2019 ; Rynning *et al.* 2018). Néanmoins il ne s'agit pas de PM_{2.5} à proprement dit. En effet, ces particules sont extrêmement bien caractérisées, et leur taille est notamment bien connue. Le NIST SRM1648a a un diamètre moyen de particules en volume à 5,85 µm, avec une distribution unimodale centrée sur 20 µm. Toutefois, selon les auteurs (Fu *et al.* 2019 ; Lee *et al.* 2019), les particules sont employées comme des PM_{2.5}. De même pour le NIST SRM2975, bien que le diamètre médian des particules est de 19,4 µm, il est également utilisé comme PM_{2.5} (Rynning *et al.* 2018).

7.1.2. Extraction des PM_{2.5}

Dans toutes les études concernées les auteurs utilisent des extraits pour exposer les cellules cependant, les protocoles utilisés diffèrent selon les études (Soxhlet et extraction assistée par ultrasons) et les solvants (H₂O, dichlorométhane, DMSO, etc.). Ceci n'est pas spécifique aux études associant PM_{2.5} et TEM, mais cela affecte la comparaison entre les publications. La nature de la solution d'extraction va influencer la composition de l'extrait, de même pour sa solubilité dans le milieu de culture (Badran, Ledoux, *et al.* 2020). Certaines données montrent que les fractions aqueuses et organiques peuvent interagir (Vuong *et al.* 2017 ; Zou *et al.* 2016) et lorsque les deux types de fractions sont combinées, la réponse obtenue peut être différente de celle attendue. Celle-ci peut ne pas correspondre à l'addition des effets obtenus avec un extrait considéré seul. Il pourrait y avoir un effet synergique ou antagoniste.

7.1.3. Méthodes d'exposition

Pour exposer les cellules de manière fiable et répétable, il faut que les conditions de culture soient standardisées. Dans les différentes études rencontrées, les temps d'expositions aux PM_{2.5} sont très variables, allant de 24 h à 30 passages de 48-72 h, ce qui correspond à 2 mois d'exposition. Les concentrations de particules sont également très variables allant de 0 à 20 µg.cm⁻² ou de 0 à 500 µg.mL⁻¹. Notons qu'il est compliqué de comparer les résultats d'études exprimant les doses exprimées dans des unités différentes. Une autre unité d'exposition est possible, en exprimant la dose d'exposition par nombre de cellules (µg/nombre

Chapitre 1

État de l'art

de cellules), semblable à la concentration en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, mais qui prend en compte les conditions d'ensemencement cellulaires. Il n'y a aujourd'hui aucun consensus sur l'utilisation d'une unité unique. Les études utilisant des modèles de puces microfluidiques n'ont pas ce problème de sédimentation (Cui *et al.* 2015), cependant, la comparaison entre un modèle microfluidique et un modèle immergé est encore complexe.

Tableau 4 : Caractéristiques des $\text{PM}_{2.5}$ disponibles (*tous les échantillons de PM sont des $\text{PM}_{2.5}$ exceptés les SRM) dans les études liées à la TEM *in vitro*

(N.S.: non spécifié ; (U): Site urbain ; (RT): Trafic routier ; (I): Site industriel ; US: Ultrasons ; B: Nombre de biomarqueurs limité ; C: Culture sur un coating qui pourrait influencer la TEM ; D: Manque d'informations sur les doses qui entraîne des problèmes de comparaison ; F: SVF dans le milieu de culture qui peut induire la TEM ; M: Pas de caractérisation morphologique de la TEM ; P: Grand nombre de passages ; R: Cellules issues de rats ; T: Temps d'exposition trop court pour observer une TEM complète)

Auteurs (année)	Type cellulaire	Conditions spécifiques de culture cellulaire	PM _{2.5}	Méthode d'extraction	Doses	Changements morphologiques (nombre de biomarqueurs)	Limites
<i>Lignée cellulaire humaine alvéolaire</i>							
Yang <i>et al.</i> (2017)	A549	72 h d'exposition	(U) Ville de Shenyang, Chine, hiver	Extraction assistée par US H ₂ O	0-20 µg/cm ²	Oui (4)	
Gualtieri <i>et al.</i> (2012)	A549	24 h d'exposition	(U) Milan, Italie, hiver et été	Extraction assistée par US H ₂ O	10 µg/cm ²	N.S. (1)	M, B, T
Huang <i>et al.</i> (2017)	A549	48 h d'exposition	(U) Nanjing & Shanghai, Chine, automne	Extraction par Soxhlet DMSO	5 µg/mL	N.S. (2)	D, M, B
Wang <i>et al.</i> (2019)	A549	5 passages (24 - 48 h / passage) 5 passages d'exposition	(U) Beijing, Chine, hiver	Extraction assistée par US Tampon salin	0-100 µg/mL	N.S. (3)	D, M, B
Yue <i>et al.</i> (2015)	A549	24 h d'exposition	Université de Shanxi, Taiyuan, Chine	Extraction assistée par US H ₂ O	0,1-10 µg/mL	N.S. (4)	D, M, T
<i>Lignée cellulaire bronchique humaine</i>							
Huang <i>et al.</i> (2017)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM + SVF 48 h d'exposition	(U) Nanjing & Shanghai, Chine, automne	Extraction par Soxhlet DMSO	5 µg/mL	N.S. (2)	D, F, M, B
Chi <i>et al.</i> (2018)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM + SVF 48 h d'exposition	(U) Nanjing, Shanghai & Ningbo, Chine, automne	Extraction par Soxhlet DMSO	0-5 µg/mL	N.S. (6)	D, F, M
Luo <i>et al.</i> (2019)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM + SVF 30 passages (48 - 72 h / passage) 30 passages d'exposition	(RT) Shanghai, Chine, hiver	Extraction assistée par US DMSO	0-5 µg/mL	Oui (7)	D, F, P
Wang <i>et al.</i> (2019)	Beas-2B	Cultivées dans du RPMI1640+SVF 5 passages (24 - 48 h / passage) 5 passages d'exposition	(U) Beijing, Chine, hiver	Extraction assistée par US Tampon salin	0-100 µg/mL	N.S. (3)	D, F, M, B
Xu <i>et al.</i> (2019b)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM + SVF 29 passages (48 h / passage) 29 passages d'exposition	(U) Shanghai, Chine	Extraction assistée par US H ₂ O Lyophilisé	50 µg/mL	N.S. (2)	D, F, P, M, B
Xu <i>et al.</i> (2019c)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM + SVF 30 passages 30 passages d'exposition	(U) Shanghai, Chine	Extraction assistée par US H ₂ O Lyophilisé	25 µg/mL	Oui (4)	D, F, P

Chapitre 1

État de l'art

Heßelbach <i>et al.</i> (2017)	Beas-2B	Cultivées dans du DMEM/F12 + SVF 5 semaines d'exposition Ajout de PM à chaque début de passage	Centrale électrique à biomasse	PM suspendues dans le milieu de culture	100 µg/mL	N.S. (7)	D, F, M
Longhin <i>et al.</i> (2018)	HBEC3-KT	6, 24, 48, 72 h d'exposition	(U) Milan, Italie, hiver	Extraction assistée par US H ₂ O	2-10 µg/cm ²	Oui (4)	
Longhin <i>et al.</i> (2016)	HBEC3-KT	24 h à 2 semaines d'exposition	Combustion de diesel et biomasse	Extraction assistée par US H ₂ O	2,5 µg/cm ²	N.S. (2)	M, B
Rynning <i>et al.</i> (2018)	HBEC3	Coating de colligène 72 h et 2 semaines d'exposition	SRM 2975: " particules atmosphériques de diesel "**	Extraction assistée par US H ₂ O	100 µg/mL	Oui (9)	D, C
Cui <i>et al.</i> (2015)	16HBE	Puce microfluidique Co-culture avec macrophages, 24, 48, 72 h d'exposition	(1) Dalian, Chine	Oscillation H ₂ O	0-200 µg/mL	N.S. (6)	D, M
Fu <i>et al.</i> (2019)	HBE	30 passages (48 - 72 h / passage) 30 passages d'exposition	SRM 1648a: " particules atmosphériques urbaines "**	Extraction assistée par US PBS	0-500 µg/mL	N.S. (5)	D, M, P
Luo <i>et al.</i> (2019)	HBE	30 passages (48 - 72 h / passage) 30 passages d'exposition	(RT) Shanghai, Chine, hiver	Extraction assistée par US DMSO	5 µg/mL	Oui (7)	D, P
<i>Autres lignées pulmonaires humaines</i>							
Yang <i>et al.</i> (2017)	H292	72 h d'exposition	(U) Shenyang city, Chine, hiver	Extraction assistée par US H ₂ O	0-20 µg/cm ²	Oui (4)	
Lee <i>et al.</i> (2019)	NCI-H441	24 h d'exposition	SRM 1648a: "particules atmosphériques urbaines"*	PM suspendues dans le milieu de culture	10 µg/mL	N.S. (6)	D, T, M
<i>Lignées cellulaires murines</i>							
Barker <i>et al.</i> (2014)	RLE-6TN	Coating de fibronectine Pression (2 à 34 kPa) 5 jours d'exposition	(RT) Atlanta, USA	Extraction assistée par US H ₂ O	0,1-10 µg/cm ²	Oui (5)	R, C
Dysart <i>et al.</i> (2014)	RLE-6TN	Coating de fibronectine Pression (2 à 34 kPa) 5 jours d'exposition	(RT) Atlanta, USA	Extraction assistée par US H ₂ O	0,1-10 µg/cm ²	Oui (2)	R, C

7.2. Regard critique et biais potentiels

7.2.1. Les modèles cellulaires de TEM

Les études portant sur les PM_{2.5} conjointement avec la TEM ont été conduites sur différents modèles cellulaires, chacun ayant ses propres caractéristiques et des réponses biologiques spécifiques. Selon l'origine cellulaire (primaires, immortalisées ou issues d'une lignée cancéreuse), les réponses peuvent être différentes. La métabolisation des composants, l'expression génique ou la présence d'organites peuvent aussi varier selon l'origine du tissu et des cellules (Freshney 2015).

De plus, chaque modèle cellulaire a ses limites, surtout dans le contexte de l'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, il faut, dans un premier temps, des cellules épithéliales qui ne présentent pas de caractéristiques mésenchymateuses. Ensuite, ces cellules doivent être capables d'effectuer cette transition, et donc d'avoir une certaine plasticité.

Les cellules bronchiques BEAS-2B possèdent des propriétés mésenchymateuses. En effet, elles sont capables d'exprimer naturellement la vimentine. Certains auteurs vont même jusqu'à les qualifier de cellules souches mésenchymateuses (Han *et al.* 2020). Ils montrent que les propriétés mésenchymateuses de ces cellules ne proviendraient pas d'une TEM mais d'un lignage d'origine mésenchymateux. Pour ces raisons, il est important d'écarter les BEAS-2B comme modèle d'exposition à des xénobiotiques dans le but d'étudier un mécanisme de TEM. Toutefois, leur sensibilité et leur capacité de réponse aux xénobiotiques tels que l'induction de réponses inflammatoires, la réponse au stress oxydant et la métabolisation des composés organiques montrent qu'elles sont un modèle robuste pour la toxicologie (Garcia-Canton *et al.* 2013 ; Méausoone *et al.* 2021 ; Park *et al.* 2015).

Les cellules A549 sont issues d'une lignée d'adénocarcinome alvéolaire. Ces cellules ont initialement muté aléatoirement et ont obtenu la capacité de se diviser indéfiniment. Cette capacité, pertinente pour la culture cellulaire, est une limite pour la comparaison à des cellules saines. Les cellules A549 possèdent des chromosomes anormaux en quantité anormale (ATCC 2021 ; Peng *et al.* 2010), très différents d'un caryotype humain. Toutefois, leur utilisation est possible en comparaison avec d'autres modèles et les réponses cellulaires induites par ce modèle sont reconnues depuis de nombreuses années. En effet, ces cellules sont capables de métaboliser les xénobiotiques (Hukkanen *et al.* 2000), d'induire des réactions inflammatoires (Holownia *et al.* 2016) et de répondre au stress oxydant (Yi *et al.* 2014). De plus, ce modèle est connu pour l'étude de la TEM (Kasai *et al.* 2005) (Tableau 4) et est capable d'exprimer des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, ZO-1, claudine-1, occludine et des cytokératines (Shimobaba *et al.* 2016 ; Tirino *et al.* 2013 ; Yang *et al.* 2017). Les

Chapitre 1

État de l'art

marqueurs mésenchymateux tels que N-cadhérine (Yang *et al.* 2015) et vimentine (Litwiniec *et al.* 2013 ; Tirino *et al.* 2013) ne sont pas ou très peu exprimés dans ces cellules.

Des modèles pulmonaires moins connus en toxicologie peuvent également être utilisés pour l'étude mécanistique de la TEM comme les Calu-1, issues d'un carcinome épidermoïde, ou les cellules H2228, issues d'un adénocarcinome.

L'utilisation de tissus primaires est conseillée, mais les procédés d'obtention de tissus humains au niveau pulmonaire sont lourds pour les patients et compliqués à mettre en place. Pour ces différentes raisons, les modèles de TEM pulmonaire font soulever des désaccords au sein de la communauté scientifique, et aucun consensus n'est disponible à ce jour sur le modèle idéal à utiliser. Chaque modèle possède ses avantages et ses inconvénients, et ces caractéristiques sont à prendre en compte avant le début de l'étude de la TEM.

7.2.2. Les méthodes de culture cellulaire

La méthodologie de culture cellulaire est primordiale et certaines études publiées ne respectent pas les recommandations de l'American Type Culture Collection (ATCC), notamment pour l'utilisation du milieu. Le milieu recommandé pour la culture des cellules BEAS-2B est le milieu LHC-9 (Gibco®) ou BEGM (Lonza®), sans ajout de sérum de veau fœtal (SVF). Dans une étude de 2015 (Zhao et Klimecki 2015), il a été démontré que la seule présence de SVF dans le milieu de culture pouvait induire la TEM chez les cellules BEAS-2B. Les auteurs ont observé des changements morphologiques, une perte de E-cadhérine, d'importants changements dans l'expression génique et notamment dans la voie Wnt. De plus, l'addition de SVF augmentait la sensibilité des cellules à l'arsénite avec des valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice médiane) cinq fois supérieures à l'IC₅₀ des cellules sans SVF ajouté au milieu (Zhao et Klimecki 2015). Parmi les 17 études présentées, 7 études utilisent les cellules BEAS-2B, et toutes utilisent du SVF dans leur milieu, ce qui pourrait invalider les conclusions de chaque étude concernant l'induction de la TEM par les PM_{2.5} (Chi *et al.* 2018 ; Heßelbach *et al.* 2017 ; Huang *et al.* 2017 ; Luo *et al.* 2019 ; Wang *et al.* 2019 ; Xu, Li, *et al.* 2019 ; Xu, Wang, *et al.* 2019) (Tableau 4).

Lors de la culture et de l'exposition aux particules, certains auteurs ont utilisé un nombre de passages élevé. Les cellules ont été remises en culture entre 30 et 40 fois, avec un temps entre chaque passage de moins de 48 h (Choo *et al.* 2016 ; Fu *et al.* 2019 ; Luo *et al.* 2019 ; Wei *et al.* 2017 ; Xu, Li, *et al.* 2019 ; Xu, Wang, *et al.* 2019). Les cellules ont généralement besoin d'un temps de passage plus long afin qu'elles se fixent à la matrice sur laquelle elles reposent (Freshney 2015). Avec des passages successifs aussi rapprochés, les

cellules peuvent ne pas avoir le temps de redémarrer leurs fonctions cellulaires de manière optimale et de proliférer. De plus, selon le type de cellules utilisées, les cellules du premier et du 40^{ème} passage peuvent avoir subi des changements considérables et ne plus avoir le même phénotype, sans même avoir été exposées aux PM_{2.5} (Freshney 2015). Ces remarques remettent en question les conclusions de certains travaux dans lesquels les auteurs ont exposé des BEAS-2B avec du SVF pendant un grand nombre de passages, malgré la présence de changements morphologiques et de marqueurs de TEM (Luo *et al.* 2019 ; Xu, Li, *et al.* 2019).

Le choix de l'environnement des cellules est primordial pour l'étude de la TEM. La matrice sur laquelle vont se développer les cellules peut induire la TEM. En effet, il a été démontré que les protéines de la MEC exercent un effet sur la TEM (Barker *et al.* 2014 ; Brown *et al.* 2013 ; Dysart *et al.* 2014 ; Royce *et al.* 2009). En conséquence, si la matrice est composée de plastique ou d'un revêtement de fibronectine, laminine, collagène I ou III, le résultat de TEM peut être influencé. Pour l'étude de TEM avec les PM_{2.5}, certains auteurs ont utilisé un revêtement de collagène (Rynning *et al.* 2018) ou de fibronectine (Barker *et al.* 2014 ; Dysart *et al.* 2014), ce qui pourrait remettre en question les conclusions tirées.

Le temps de culture pendant lequel les cellules sont exposées aux polluants afin de déclencher la TEM, est limité à 24 h dans certaines études. En sachant que le phénotype mésenchymateux complet n'est pas toujours obtenu, il est possible qu'une courte exposition de 24 à 48 h ne soit pas suffisante pour obtenir un profil mésenchymateux. À des états précoces, les caractéristiques épithéliales peuvent diminuer, mais les caractéristiques mésenchymateuses ne sont pas encore établies.

Par ailleurs, des études récentes montrent que pour avoir un résultat fiable de TEM, il est indispensable d'avoir une étude morphologique des cellules, ainsi qu'un certain nombre de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Sur les 18 études portant sur PM_{2.5} et TEM, seules 7 combinent une étude morphologique et l'observation d'au moins 4 biomarqueurs de TEM (Barker *et al.* 2014 ; Dysart *et al.* 2014 ; Longhin *et al.* 2018 ; Luo *et al.* 2019 ; Rynning *et al.* 2018 ; Xu, Li, *et al.* 2019 ; Yang *et al.* 2017).

7.2.3. Les méthodes d'exposition aux PM_{2.5}

Pour ce qui est de l'exposition aux particules fines, il est nécessaire d'avoir des concentrations inférieures aux concentrations qui affectent la viabilité cellulaire. Dans l'étude de Dysart *et al.* (2014), les auteurs ont travaillé avec des concentrations de 10, 25 et 50 µg.cm⁻², pour lesquelles le taux de viabilité cellulaire était respectivement de 99, 83 et 56 %.

Chapitre 1

État de l'art

Ici, seule la concentration à $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ n'affecte pas de manière significative la viabilité cellulaire. Ces concentrations ne sont pas représentatives des valeurs environnementales et sont même plus hautes que les valeurs retrouvées dans les villes et milieux de travail les plus pollués. Toutefois, de telles valeurs sont courantes dans les études *in vitro* couplées aux particules atmosphériques. Il est nécessaire de trouver un compromis afin d'observer une réponse cellulaire dans un temps défini par le design expérimental, tout en maintenant l'intégrité de la cellule pendant la période d'exposition. De plus, en considérant un dépôt réaliste des particules dans les poumons, certaines méthodes peuvent être questionnées. Les cellules sont généralement submergées dans le milieu de culture avec les polluants dans une solution ou une suspension, dans une flasque ou sur une puce microfluidique. Dans un environnement immergé, la dosimétrie est mal estimée et les cellules peuvent être sur- ou sous-exposées, en particulier avec les $\text{PM}_{2.5}$ qui peuvent sédimenter sur les cellules. De nouvelles techniques permettent l'amélioration des méthodes d'exposition comme l'exposition en interface air-liquide qui permet une exposition plus réaliste en termes d'interaction des $\text{PM}_{2.5}$ avec les cellules. Ainsi les doses d'exposition peuvent être fixées à des valeurs représentatives de celles rencontrées dans l'environnement (Gualtieri *et al.* 2018).

Des modèles de déposition des particules existent *in silico*. Toutefois, imiter une déposition complexe *in vitro* n'est pas encore possible à réaliser. Il n'existe pas de protocole expérimental de modèle de déposition en 3 dimensions. À cela s'ajoute la complexité des modèles de culture multicellulaires respectant l'organisation structurale des cellules bronchiques (cellules épithéliales, cellules ciliées, et cellules caliciformes à mucus). Le nombre de modèle cellulaire ne fait qu'augmenter ces dernières années, en particulier pour les cellules pulmonaires. De nouveaux modèles pourront un jour mettre un terme à certains des biais d'expositions que nous rencontrons aujourd'hui, comme l'exposition en interface air-liquide ou l'interaction des cellules épithéliales avec le système immunitaire (Yaquub *et al.* 2022).

7.3. Choix d'un témoin positif

Un témoin positif est essentiel pour la validation de chaque étude scientifique. Pour l'étude de la TEM, trois témoins positifs qui sont des inducteurs de TEM, sont largement utilisés *in vitro*. TGF- β est un inducteur direct de la TEM dans des conditions physiologiques lorsqu'il est surexprimé. Si l'on expose des cellules A549, issues d'un adénocarcinome, ou des cellules BEAS-2B, qui sont des cellules bronchiques immortalisées, à TGF- β , il est possible d'observer une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux accompagnée d'une augmentation des marqueurs mésenchymateux, ainsi que des changements morphologiques. Ceci confirme l'induction de la TEM par TGF- β (Doerner et Zuraw 2009 ; Kasai *et al.* 2005 ; Li *et al.* 2015 ; Yang *et al.* 2017). Par conséquent, TGF- β peut être utilisé comme un témoin positif pour

activer la TEM néanmoins, dans ce cas TGF- β ne pourra plus être utilisé en tant que biomarqueur de la TEM.

La bléomycine est un inducteur de TEM, notamment pour les modèles murins de fibroses (Brown *et al.* 2013 ; Wu *et al.* 2007). Il active TGF- β après avoir été transformé, et est ainsi un inducteur indirect de TEM. Dans ce cas, le délai d'activation de la TEM est supérieur à celui de la TEM induite par l'ajout direct de TGF- β .

Le dernier témoin positif employé est le benzo(a)pyrène (BaP). Plusieurs études ont montré l'induction de TEM après exposition au BaP (Xi Chen *et al.* 2017 ; Wang *et al.* 2015 ; Wu *et al.* 2020 ; Yang *et al.* 2018). Après l'exposition au BaP, il y a bien une diminution des marqueurs épithéliaux et une augmentation des marqueurs mésenchymateux, mais également une augmentation des capacités de migration et d'invasion. Le BaP induirait la TEM par la voie AhR et par la voie canonique TGF- β , toutefois aucun consensus sur la voie impliquée n'a été atteint (Dietrich et Kaina 2010 ; Reyes-Reyes *et al.* 2016 ; Rico-Leo *et al.* 2013).

Ces trois méthodes permettent d'activer la TEM à différents niveaux, mais des résultats similaires ont été obtenus en utilisant du BaP ou TGF- β (Reyes-Reyes *et al.* 2017).

7.4. Mise en évidence de la TEM induite par les PM_{2.5}

Parmi les 18 études ayant exposé des cellules aux PM_{2.5} pour l'étude de la TEM, il y a une grande hétérogénéité notamment sur les caractéristiques des PM_{2.5}, le protocole de culture cellulaire et sur l'analyse de la TEM. De plus, le nombre d'études fiables sur le sujet est limité et leur hétérogénéité rend la comparaison entre études complexe.

Deux études ressortent comme étant les plus rigoureuses. La première réalisée par Longhin *et al.* (2018), a étudié le rôle de *SERPINB2*, codant pour la protéine PAI2, dans la TEM lorsque des cellules bronchiques HBEC3-KT sont exposées à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de PM_{2.5} pendant 48 h. Dans des études génomiques précédentes, la même équipe a pu observer la modification des gènes *CDH1* (codant pour la E-cadhérine) et *SERPINB2* après une exposition des cellules aux PM_{2.5} (Gualtieri *et al.* 2012a ; Longhin, Gualtieri, *et al.* 2016). Les auteurs ont pu remarquer des changements morphologiques ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette d'actine, et des changements dans les marqueurs de TEM telle qu'une diminution de E-cadhérine mais pas d'augmentation de la vimentine. Les auteurs ont également fait un test de régénération cellulaire (Wound Healing Assay). Ce test consiste à créer une plaie artificielle sur des cellules à confluence en monocouche, afin de voir si les cellules migrent pour réparer la blessure. Ici la densité relative de la blessure est mesurée. Il est montré qu'il n'y a pas d'augmentation de la migration cellulaire par rapport au témoin sur les 24 h suivant les 48 h d'exposition aux PM_{2.5}. Une étude génomique complémentaire ne montre pas de changement

Chapitre 1

État de l'art

dans l'expression des ARNm *CDH1*, *CDH2* et vimentine. D'après ces résultats, la conclusion sur la TEM semble difficile, il est probable que ce soit un état précoce de la transition, d'où le faible niveau de marqueurs mésenchymateux.

La deuxième étude, réalisée par Yang *et al.* (2017), porte sur deux lignées cancéreuses, A549 issue d'un adénocarcinome, et H292 issue d'un carcinome muco-épidermoïde. Les cellules ont été exposées aux PM_{2.5} à 5, 10 ou 20 µg.cm⁻² pendant 72 h avec TGF-β comme témoin positif de TEM. Pour les deux types cellulaires, une transformation morphologique des cellules a été mise en évidence, ainsi qu'un changement des marqueurs épithéliaux pour des marqueurs mésenchymateux à tous les niveaux (génique, protéique et en microscopie). Des tests comme le Transwell Invasion Assay ont été effectués. Ce test permet de vérifier l'invasion des cellules à travers une membrane poreuse vers un milieu comprenant un chimio-attractant. Ici les cellules exposées aux PM_{2.5} ont montré des capacités de migration et d'invasion significativement supérieures. La voie impliquée dans le processus de cette TEM serait la voie SMAD1 et miR32 serait un inhibiteur de la TEM induite par les PM_{2.5}.

Une autre étude intéressante a été effectuée sur des BEAS-2B, des cellules bronchiques immortalisées, par Thevenot *et al.* (2013). Les cellules ont été exposées à des particules ultrafines sous la forme de silice amorphe contenant 3 % d'oxyde de cuivre avec du 1,2-dichlorobenzène. Ces particules ultrafines reproduisent les radicaux libres persistant dans l'environnement. Après 24 h d'exposition à 20 µg.cm⁻², les cellules avaient subi des changements de morphologie et de biomarqueurs. La E-cadhérine épithéliale a diminué et α-SMA, le collagène et pFAK mésenchymateux ont augmenté. De plus, cette étude a permis d'observer une augmentation du stress oxydant, de la nucléarisation lysosomique qui traduit une peroxydation lipidique, ainsi qu'une augmentation de la réponse antioxydante. Certains marqueurs de voie de signalisation ont été modifiés comme en a témoigné l'élévation de l'expression des répresseurs de la E-cadhérine (*SNAI1*, *SNAI2*, *SNAI3*, *TCF3*, *TCF4*, *ZEB1* et *ZEB2*) avec une baisse de l'expression des protéines de jonction cellulaire (caténine β1, desmoplakine, Notch1 et occludine). La dégradation et le remodelage de la MEC ont également été observés et associés à l'augmentation de MMP3, MMP9, TGF-β1, TGF-β2 et TGF-β3. Dans cette étude les particules étaient des particules de synthèse et non représentatives des PM_{2.5}, mais la stratégie employée par Thevenot *et al.* (2013) doit être considérée comme un exemple pour les études de TEM et PM_{2.5}.

L'équipe de Barker *et al.* (2014) et Dysart *et al.* (2014) a étudié le rôle du stress mécanique et des PM_{2.5} sur la TEM chez des cellules alvéolaires de rats. Pour cela ils ont mis les cellules en culture pendant 5 jours avec 0,1, 1 et 10 µg.cm⁻² de PM_{2.5} collectées à Atlanta (Etats-Unis d'Amérique), sur un gel de polyacrylamide recouvert de fibronectine ou laminine, sur lequel ils ont appliqué une pression de 2, 8, 16 ou 24 kPa au-dessus de la pression atmosphérique. La pression exercée est censée recréer des conditions physiologiques respiratoire et pathologiques de fibrose. Dans un témoin de MEC, la TEM était induite uniquement en changeant la nature de la couche mise sur le gel en polyacrylamide. Lorsque les cellules étaient en contact avec de la laminine, les cellules avaient un profil épithélial, alors qu'en contact avec la fibronectine, elles présentaient un profil mésenchymateux. A une pression de 8 kPa, des changements morphologiques significatifs du passage d'un profil épithélial à mésenchymateux ont été observés, ainsi qu'une augmentation de la rigidité des cellules. La concentration en TGF-β et en ERO a augmenté de manière proportionnelle à la concentration en PM_{2.5} et à la pression. Cette étude permet de voir à quel point le microenvironnement peut influencer la TEM et le modèle pulmonaire. Toutefois, aucun témoin considérant uniquement les PM_{2.5} (sans pression additionnelle) n'a été envisagé et il est possible que la couche de fibronectine ait influencé l'apparition de la TEM (Zeisberg et Neilson 2009).

7.5. Relation entre composition des PM_{2.5} et TEM

Les données concernant la composition des particules pour les différentes études liant la TEM et les PM_{2.5} sont données dans le Tableau 5. L'objectif est ici de voir si un composant en particulier peut induire la TEM. La composition des PM_{2.5} dépend fortement de la source et de l'origine géographique des particules. La plupart des PM_{2.5} étudiées proviennent d'un site sous l'influence d'un environnement urbain (8 études sur 18), suivi de l'influence du trafic routier (3 études sur 18) ainsi que l'influence industrielle (1 étude sur 18). Les autres particules proviennent d'un environnement contrôlé tel que les émissions de diesel ou combustion de biomasse, ou encore d'un échantillon de référence de composition parfaitement connue (Tableau 4 et Tableau 5). La composition des PM_{2.5} est souvent fournie dans les données supplémentaires ou dans un autre article publié en parallèle à l'article portant sur la TEM. Toutefois, ces données n'étaient pas fournies pour 3 articles (Chi *et al.* 2018 ; Cui *et al.* 2015 ; Huang *et al.* 2017). La composition des particules permet de décrire l'échantillon voire parfois de déterminer les influences principales et les sources qui contribuent à la composition de l'échantillon. Néanmoins, les données fournies, à l'exception des SRM, ne couvrent pas l'intégralité des familles chimiques connues et possiblement détectables dans les particules. Il est important de noter que la TEM induite dans ces études a pu être initiée par des composants

Chapitre 1

État de l'art

des PM qui n'ont pas été considérés pour l'étude chimique, en particulier pour les études qui ont étudié uniquement les composants majeurs des PM_{2.5} tel que le carbone et les ions majeurs. Barker *et al.* (2014) et Dysart *et al.* (2014) ont fourni des informations uniquement sur les composantes en carbone élémentaire et organique, et sur trois ions NH₄⁺, NO₃⁻ et SO₄²⁻. Heßelbach *et al.* (2017) ont par exemple donné des indications sur les ions Ca²⁺, K⁺, SO₄²⁻ et Cl⁻. Wang *et al.* (2019) ont été les seuls à fournir des informations sur la teneur en endotoxines dans leur échantillon.

Pour autant, dans les autres études, des informations sur la composition en métaux et HAP est fournie. Celles-ci sont spécifiées et classées dans le Tableau 5 dans l'ordre décroissant de leurs concentrations. Les métaux les plus abondants dans les particules utilisées dans ces études de TEM étaient Al, Fe, Zn, Ca, Cu, Mg et Mn. Pour les HAP, les plus abondants sont le chrysène, fluoranthène, BaP, benzo(e)pyrène et benzo(b)fluoranthène. Toutefois dans la littérature, aucun lien n'est mis en évidence entre un composé prédominant et le développement de la TEM.

Chaque constituant ou famille de composés des PM_{2.5} possède une toxicité et des cibles qui peuvent être différentes. Certains composants sont déjà connus pour être impliqués dans les mécanismes d'inflammation et de stress oxydant (Figure 5), mais aussi pour l'activation de facteurs de transcription de la TEM (Figure 9). De plus, la composition complexe des PM_{2.5} pourrait impliquer des effets cocktails, activant plusieurs voies associées à la TEM de manière synergique. Afin de savoir quelle est la réponse cellulaire et la voie de signalisation induite pour chaque composé, il faudrait concevoir une étude prenant en compte des composants seuls et en mélange pour comprendre de manière plus spécifique le rôle des composants chimiques des PM_{2.5} associés à l'activation de la TEM.

Tableau 5 : Composition des PM_{2.5} (*tous les échantillons sont des PM_{2.5} exceptés les SRM) utilisés dans les études d'induction de TEM *in vitro*. Les composants des PM_{2.5} sont classés par famille (métaux, HAP, endotoxines, carbone et ions) et présentés par ordre d'abondance. (Il est important de noter que les informations données correspondent aux espèces analysées et non à la composition complète des PM_{2.5})

(N.S. : non spécifié mais testé ; - : pas de données ; (U) : site urbain ; (RT) : Trafic routier ; (I) : Site industriel ; PAH : acénaphthène (Ace), anthracène (Ant), benz(a)anthracène (BaA), benzo(a)pyrène (BaP), benzo(b)fluoranthène (BbF), benzo(e)pyrène (BeP), benzo(ghi)fluoranthène (BghiF), benzo(ghi)perylène (BghiP), benzo(k)fluoranthène (BkF), chrysène (Chr), fluoranthène (Fla), fluorène (Flu), indeno(1,2,3-cd)pyrène, (InPy), naphtalène (Nap), pyrène (Pyr), phénanthrène (Phe))

Composants des PM identifiés par famille et par ordre d'abondance

Auteurs (Année)	Origine des PM	Métaux	HAP	Endotoxines	Carbone	Ions
<i>Lignée cellulaire humaine alvéolaire</i>						
Yang <i>et al.</i> (2017)	(U) Ville de Shenyang, Chine, hiver	Mn, Zr, Cu, Cr, V, Na, Ca	BkF, Chr, InPy, BaA, BaP, Ant	-	-	SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺
Gualtieri <i>et al.</i> (2012)	(U) Milan, Italie, hiver et été	K, Cl, Fe, P, Al, Ni, Si, Ca, Zn, Pb	BeP, Chr, BbF, BghiF, InPy, BaA, BaP, BkF	-	OC, EC	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , SO ₄ ²⁻
Huang <i>et al.</i> (2017)	(U) Nanjing & Shanghai, Chine, automne	-	-	-	-	-
Wang <i>et al.</i> (2019)	(U) Beijing, Chine, hiver	Fe, Al, Mg, Cu, Zn, Pb, Mn, Cr, Ni	-	20.8 mg/m ³	-	-
Yue <i>et al.</i> (2015)	Université de Shanxi, Taiyuan, Chine	-	BbF, InPy, Chr, BaA, Fla, BghiP, BaP, BeP, Pyr, BkF	-	-	NH ₄ ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺ , SO ₄ ²⁻
<i>Lignée cellulaire bronchique humaine</i>						
Huang <i>et al.</i> (2017)	(U) Nanjing & Shanghai, Chine, automne	-	-	-	-	-
Chi <i>et al.</i> (2018)	(U) Nanjing, Shanghai & Ningbo, Chine, automne	-	-	-	-	-
Luo <i>et al.</i> (2019)	(RT) Shanghai, Chine, hiver	Ca, Na, Al, Fe, K, Mg, Zn	InPy, Flu, BaA, BbF, BghiP, BaP, BkF, Chr	-	-	-
Wang <i>et al.</i> (2019)	(U) Beijing, Chine, hiver	Fe, Al, Mg, Cu, Zn, Pb, Mn, Cr, Ni	-	20.8 mg/m ³	-	-
Xu <i>et al.</i> (2019b)	(U) Shanghai, Chine	Ca, Fe, Na, K, Al, Mg, Zn, Mn, Pb, Cu	Nap, Ace, InPy, BbF, Flu, Pyr, BkF, BghiP, Fla, BaP, Chr	-	OC, EC	SO ₄ ²⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺
Xu <i>et al.</i> (2019c)	(U) Shanghai, Chine	Ca, Fe, Na, K, Al, Mg, Zn, Mn, Pb, Cu	Nap, Ace, InPy, BbF, Flu, Pyr, BkF, BghiP, Fla, BaP, Chr	-	OC, EC	SO ₄ ²⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺

Chapitre 1
État de l'art

Hebelbach <i>et al.</i> (2017)	Centrale électrique à biomasse	-	-	-	-	K ⁺ , SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , Ca ²⁺
Longhin <i>et al.</i> (2018)	(U) Milan, Italie, hiver	Fe, Al, Si, V, Cr, Zn, Cd	N.S.	-	OC, EC	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , Ca ²⁺
Longhin <i>et al.</i> (2016)	Combustion de diesel et biomasse	Ca, Al, Zn, K	Phe, Pyr, Fla, BeP	-	-	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Rynning <i>et al.</i> (2018)	SRM 2975 : " particules atmosphériques de diesel "**	K, Ca, Zn, Mn	Pyr, Fla, Phe, Chr	-	-	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Fu <i>et al.</i> (2019)	SRM 1648a : "particules atmosphériques urbaines"*	Ca, S, Fe, Al, K, Mg, Pb, Zn, Cl, Na, Ti	BbF, Fla, Chr, Pyr, BghiP, Phe, BeP, InPy, Nap	-	OC, EC	-
Luo <i>et al.</i> (2019)	(RT) Shanghai, Chine, hiver	Ca, Na, Al, Fe, K, Mg, Zn	InPy, Flu, BaA, BbF, BghiP, BaP, BkF, Chr	-	-	-
<i>Autres lignées pulmonaires humaines</i>						
Yang <i>et al.</i> (2017)	(U) Ville de Shenyang, Chine, hiver	Mn, Zr, Cu, Cr, V, Na, Ca	BkF, Chr, InPy, BaA, BaP, Ant	-	-	SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺
Lee <i>et al.</i> (2019)	SRM 1648a : "particules atmosphériques urbaines"*	Ca, S, Fe, Al, K, Mg, Pb, Zn, Cl, Na, Ti	BbF, Fla, Chr, Pyr, BghiP, Phe, BeP, InPy, Nap	-	OC, EC	-
<i>Lignées cellulaires murines</i>						
Barker <i>et al.</i> (2014)	(RT) Atlanta, USA	-	-	-	OC, EC	SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻
Dysart <i>et al.</i> (2014)	(RT) Atlanta, USA	-	-	-	OC, EC	SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻

8. Objectifs de la thèse

À l'issue de cette étude bibliographique, il apparaît qu'une exposition aux $PM_{2.5}$ peut déclencher certains mécanismes de toxicité pulmonaire. Les $PM_{2.5}$ possèdent une composition chimique variée qui va dépendre des sources d'émissions, et donc de leurs origines. Ces $PM_{2.5}$ sont capables d'entrer dans les voies respiratoires et d'interagir avec les cellules pulmonaires. Plusieurs mécanismes seront alors mis en œuvre, parmi lesquels certains sont parfaitement documentés. Un mécanisme en particulier a été peu étudié, la Transition Épithélio-Mésenchymateuse. Un certain nombre d'études existent, mais sont pour le moins critiquables, notamment pour le modèle cellulaire ou les méthodes utilisées. Il est dès lors risqué de se baser sur celles-ci pour conclure sur un lien entre $PM_{2.5}$ et déclenchement de la TEM. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse sont les suivants :

➔ Le premier est de caractériser des $PM_{2.5}$ sur quatre sites sous influences contrastées : urbaines, du trafic routier, industrielles, et maritime. Ainsi, quatre sites pertinents de la région ont été choisis : le premier dans la métropole de Lille, le deuxième à proximité d'un boulevard très fréquenté à Roubaix, le troisième sur l'agglomération de Dunkerque, là où se situent les trois quarts des émissions industrielles de la région, et le dernier dans la ville de Calais, à proximité du port qui est le premier français et deuxième européen en transport de personnes et de marchandises roll-on/roll-off, et à proximité du détroit du Pas-de-Calais.

Ces particules ont été caractérisées pour déterminer leur composition élémentaire, en métaux, en ions inorganiques hydrosolubles, en composés organiques et en endotoxines. L'ensemble des données recueillies a permis d'identifier les sources majeures d'émission sous ces 4 influences. De manière à aller plus loin dans la caractérisation de l'influence maritime et industrielle, nous avons aussi ciblé plus spécifiquement des échantillons collectés sous le vent des émissions portuaires et maritime d'une part et de l'industrie d'autre part. Cette sélection a été faite en se basant sur les données de vents et la composition chimique.

➔ Le deuxième objectif est d'étudier les effets toxiques de $PM_{2.5}$ en fonction des quatre influences ciblées.

Dans un premier temps, nous évaluerons la cytotoxicité des particules afin de définir des doses d'exposition qui seront utilisées dans l'étude des mécanismes de cytotoxicité et de la TEM. Pour cela, les $PM_{2.5}$ des quatre sites seront extraites. Quatre extraits contenant la fraction hydrosoluble et quatre extraits contenant la fraction organique des $PM_{2.5}$ ont été constitués à partir des filtres prélevés sur chacun des sites.

Pour cela, des cellules pulmonaires épithéliales A549 et BEAS-2B seront exposées aux extraits de $PM_{2.5}$ pendant 24 à 72 h. Ces deux modèles sont différents : le premier est

Chapitre 1

État de l'art

alvéolaire et issu d'une lignée cancéreuse, le deuxième est bronchique et issu de cellules immortalisées. Ces cellules seront exposées de manière immergée, qui est la méthode la plus courante et la plus maîtrisée. L'étude toxicologique se divisera alors en trois points : l'étude de la mortalité, viabilité et prolifération cellulaire, et permettra d'établir les doses d'exposition pour l'étude mécanistique. Ces doses d'exposition se situeront en dessous de la concentration létale 10 % (CL₁₀).

Dans un deuxième temps, certains mécanismes connus pour être induits par les particules fines seront étudiés : la réponse inflammatoire, le stress oxydant et la métabolisation des xénobiotiques.

➔ Le troisième objectif concerne l'étude de l'induction de la TEM par les PM_{2.5}. Il s'agit d'un mécanisme peu étudié mais qui pourrait être impliqué dans plusieurs maladies pulmonaires connues pour être induites ou exacerbées par l'exposition aux particules.

Ainsi, des cellules épithéliales pulmonaires A549 seront exposées aux extraits de PM_{2.5} prélevées pendant 72 h à 7 jours. Pour ces expositions, comme expliqué précédemment, les conditions de culture doivent être très contrôlées. Ainsi, les cellules seront cultivées sans coating préalable. Un témoin positif sera utilisé pour s'assurer du bon fonctionnement du modèle cellulaire et de l'exposition : TGF- β . Enfin, pour valider ou non l'activation de la TEM, deux méthodes seront combinées : l'étude morphologique et l'étude d'au moins quatre biomarqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

➔ L'objectif final sera d'identifier s'il existe un effet particulier selon l'origine des PM_{2.5} et si l'une des influences considérées est capable d'induire la TEM de manière plus prononcée.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Échantillonnage, mesure et analyse des PM_{2.5}

Quatre sites de prélèvement ont été sélectionnés afin de répondre au mieux aux objectifs de l'étude (Figure 10). Un site urbain se trouvant à Lille, un site sous l'influence du trafic routier à Roubaix, un site sous l'influence maritime à Calais et un site sous l'influence industrielle à Dunkerque.

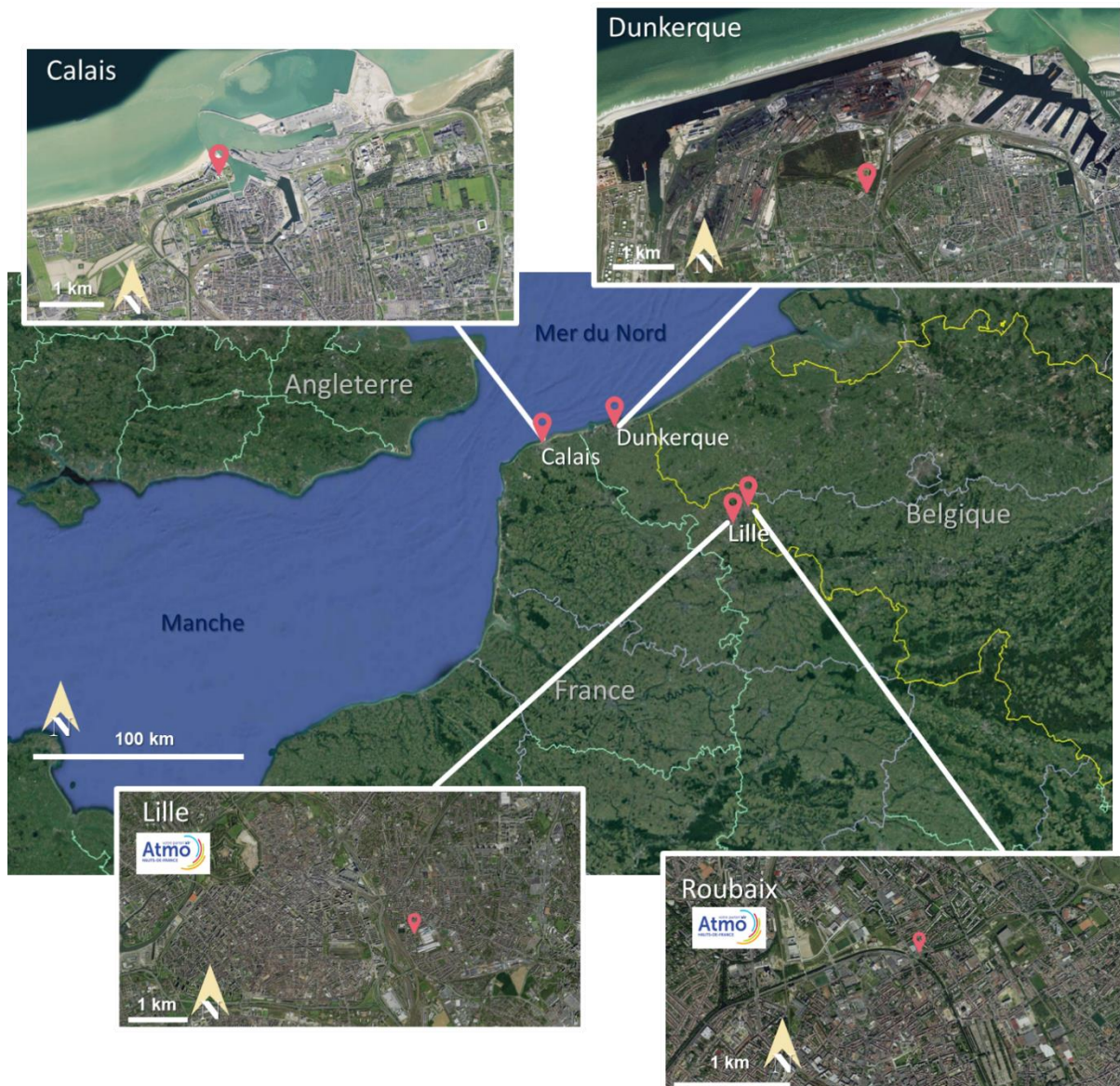


Figure 10 : Localisation des 4 sites de prélèvement de PM_{2.5} des campagnes de mesure

1.1. Campagnes de prélèvement

1.1.1. Site de typologie urbaine : Lille

Nous nous sommes appuyés sur l'expertise du réseau de surveillance de la qualité de l'air Atmo Hauts-de-France pour choisir au mieux nos sites de typologie bien identifiée. Ainsi le site localisé dans le quartier de Lille Fives possède une typologie de type urbaine et une station du réseau a été mise à disposition pour réaliser notre campagne. Cette station (50°37'40.96"N, 3°5'25.38"E) se situe au sein de la métropole européenne de Lille, la deuxième agglomération française en densité de population avec 1 765 habitants.km², et quatrième par sa taille avec un total de 1 146 320 habitants (INSEE 2017b). La station se trouve dans une école primaire, entourée de quartiers résidentiels (Figure 11). Elle est à 300 mètres de la voie ferrée (technicentre SNCF), qui voit passer un faible nombre de trains quotidiennement. A 1,5 km au sud du site se trouve l'échangeur de l'A25 et l'A1 sur lequel un très grand nombre d'usagers circulent.

Les prélèvements sur ce site ont débuté le 30 septembre 2020 et ont pris fin le 19 novembre 2020. Le DA-80 était mis à l'extérieur, au niveau du sol, avec une tête de prélèvement à 3 m de hauteur. La station Atmo présente sur place permet d'avoir en temps réel les données de concentration en PM_{2.5}, nous permettant de compléter nos données. Les données de vent montrent une forte proportion de vents provenant de la moitié sud (Figure 11).



Figure 11 : Localisation du site de prélèvement sous influence urbaine à Lille Fives et rose des vents au cours de la campagne

1.1.2. Site de typologie trafic routier : Roubaix

Le deuxième site, focalisant sur les émissions associées au trafic routier, est localisé à Roubaix (50°42'23.68"N, 3°10'50.57"E), au niveau des serres municipales. Il s'agit également d'une station de mesures mise à disposition par Atmo Hauts-de-France. La ville de Roubaix compte 98 000 habitants et fait partie de la métropole européenne de Lille. La station se trouve aux abords d'un boulevard très fréquenté (Figure 12) et à 4 et 8 km de distance d'autoroutes.

Les prélèvements sur cette station ont débuté le 30 septembre 2020 et ont pris fin le 19 novembre 2020, simultanément à la campagne menée à Lille. Le préleveur était placé dans la station Atmo, avec une tête de prélèvement à plus de 3 m de hauteur. Tout comme pour le site urbain, les données de concentration de PM_{2.5} de la station Atmo de Roubaix « Serres » pourront compléter nos données. Les données de vent montrent une prédominance des vents venant du carrefour giratoire situé au sud-ouest de la station (Figure 12).



Figure 12 : Localisation du site de prélèvement sous influence trafic routier à Roubaix et rose des vents au cours de la campagne

1.1.3. Site sous influence du trafic maritime : Calais

Dans la région, plusieurs grands ports sont présents : ils sont situés à Boulogne-sur-Mer, Dunkerque et Calais. Le port de Calais, maintenant appelé Port Boulogne Calais, est le premier port français pour le transport de passagers avec 9 millions de voyageurs en 2018, et le deuxième européen pour le transport de voyageurs et marchandises par engins roulant, appelé Roll-on/Roll-off, grâce à sa proximité avec l'Angleterre. Ses huit quais sont destinés aux ferrys, aux navires rouliers (Roll-on/Roll-off) et au transport de fret. A la différence du port de Dunkerque, il est peu soumis aux influences industrielles.

Nous avons retenu le site de Calais pour réaliser la campagne d'échantillonnage de particules sous influence maritime et portuaire. Pour des raisons pratiques, le site sera nommé

Chapitre 2

Matériels et méthodes

« influence maritime » par la suite. Nous avons eu l'autorisation de la mairie de Calais pour placer le préleveur de particules sur le toit du complexe de GRS Delphine LEDOUX (50°57'49.82"N, 1°50'42.26"E) situé face au port (Figure 13). Ce site était soumis aux émissions portuaires et maritimes pour des secteurs de vent allant d'Ouest en Est : portuaire pour la proximité avec le port dans lequel les ferrys sont à quai et doivent effectuer une manœuvre de retournement pour sortir et repartir vers Douvres, et maritime pour la proximité avec le détroit du Pas-de-Calais dans l'espace Manche-Mer du Nord, où plus de 400 navires commerciaux transitent quotidiennement, auxquels s'ajoutent les navires de pêche et de plaisance (CROSS Gris-Nez 2020). C'est l'un des espaces maritimes les plus fréquentés au monde, c'est un point stratégique reliant les villes d'Europe du Nord à l'Asie et l'Amérique. De plus, 75 000 personnes habitent la ville de Calais. Celle-ci est bordée par l'A16 au Sud de la ville, et des grands axes routiers rejoignent le port par l'Ouest.

Les prélèvements ont eu lieu du 21 novembre 2020 au 14 janvier 2021. Une station Atmo qui mesure les niveaux de concentration en $PM_{2.5}$ se trouve à moins de 2 km de notre site de prélèvement, la station de Calais Berthelot. Celle-ci nous permettra d'avoir une information sur les niveaux de concentration de particules. La rose des vents montre que les vents pour ce site provenaient en majorité du Sud-Ouest (46 %) et Sud-Est (23 %) durant la période étudiée (Figure 13).



1.1.4. Site sous influence de l'industrie : Dunkerque

Dans la région HdF, Dunkerque est un chef-lieu de l'industrie. On y retrouve des industries classées SEVESO évoluant dans des secteurs divers notamment la sidérurgie, la métallurgie, la synthèse organique, etc. (Figure 14). Deux entreprises, ArcelorMittal et Aluminium Dunkerque, représentent à elles-seules plus de 70 % des rejets canalisés de poussières industrielles de la région (DREAL Hauts-de-France 2020). Arcelor Mittal est une aciérie intégrée s'étendant sur plus de 7 km², avec 3 200 salariés. Le site importe plus de 9,5 millions de tonnes de minerai de fer ainsi que plus de 4,5 millions de tonnes de charbon. Le minerai est transformé en aggloméré, le charbon en coke, et les deux sont placés dans l'un des trois hauts fourneaux pour être fondus. La fonte brute part à destination de l'aciérie, afin d'être transformée en acier, puis mis en forme dans les laminoirs. Aluminium Dunkerque, du groupe American Industrial Partners, est une entreprise plus petite, étendue sur 0,65 km² avec 547 salariés en 2017. Elle produit 248 000 tonnes d'aluminium par an à partir d'alumine, selon un procédé électrolytique. D'après la direction générale de l'environnement, de l'aménagement et du logement (DREAL), en 2018 ces deux entreprises auraient émis plus de 3 400 tonnes de poussières en sortie de cheminée (DREAL Hauts-de-France 2020). C'est pourquoi nous avons choisi Dunkerque comme site sous influence des émissions industrielles. Le préleveur a été installé au niveau du Centre d'Incendie et de Secours de Fort Mardyck (21°1'54.85"N, 2°18'57.66"E).

D'autres part, Dunkerque est possiblement soumise à d'autres influences. Elle est bordée par la mer sur tout le front Nord et possède le troisième plus grand port français qui s'étend sur plus de 70 km². La ville de Dunkerque en elle-même comporte 87 000 habitants, et la communauté urbaine de Dunkerque, qui rassemble 17 communes, compte 198 000 habitants. Au Sud de la ville se trouvent les autoroutes A16 et A25 qui permettent de rallier la Belgique, Calais et Lille.

Afin d'obtenir les concentrations en PM_{2.5} sur le site, un analyseur Environnement SA MP101 a été placé en parallèle à notre préleveur de particules. Elles pourront être comparées à celles d'une station Atmo HdF se situant à Malo-les-Bains, à 7 km à l'Est du site de prélèvement. Les échantillonnages sur le site de Dunkerque ont eu lieu en parallèle à ceux sur le site de Calais, sur la période du 21 novembre 2020 au 05 janvier 2021. Les vents sur la période de prélèvement étaient majoritairement en provenance du Sud (Figure 14).

Chapitre 2

Matériels et méthodes



Figure 14 : Localisation du site de prélèvement sous influence industrielle, localisé à Fort Mardyck dans l'agglomération de Dunkerque (1 : industrie sidérurgique intégrée, 2 : usine de ferromanganèse ; 3 : cimenterie ; 4 : industrie de polypropylène) et rose des vents au cours de la période d'étude

La synthèse des informations relatives aux prélèvements effectués au cours de la thèse est donnée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Synthèse des prélèvements de $PM_{2.5}$

Influence	Site	Période	Nombre d'échantillons
Urbaine	Lille	29/09/20 – 19/11/20	49
Trafic routier	Roubaix	29/09/20 – 19/11/20	50
Maritime	Calais	21/11/20 – 14/01/21	51
Industrielle	Dunkerque	21/11/20 – 05/01/21	46

1.2. Méthodes d'échantillonnage et données météorologiques

1.2.1. Conditionnement du matériel de prélèvement

Tout le matériel à destination du prélèvement de particules atmosphérique a été nettoyé à l'aide d'un détergent de laboratoire Extran (Merck®), puis rincé à l'eau déminéralisée puis eau ultrapure et mis à sécher sous hotte à flux laminaire, et conservés dans des sachets en plastique hermétiques jusqu'à utilisation.

1.2.2. Prélèvement des particules

Sur chaque site, des prélèvements de 24 h ont été réalisés pendant 45 à 51 jours, entre octobre 2020 et janvier 2021, à l'aide d'un préleveur haut débit DIGITEL® DA-80, fonctionnant à un débit constant de 30 m³/h. Le préleveur était surmonté d'une tête sélectionnant les particules avec un DAE inférieur ou égal à 2,5 µm ($PM_{2.5}$).

Les particules ont été prélevées sur des filtres en fibre de quartz sans liant (PALL® 2500QAT-UP) de 150 mm de diamètre. Ces filtres ont préalablement été chauffés à 450°C pendant 4 heures pour éliminer les impuretés organiques. Les filtres ont ensuite été montés sur un porte-filtre, et placés dans le magasin du DA-80, programmé pour changer automatiquement de filtre toutes les 24 h. Ce magasin était réalimenté une fois par semaine, et une visite sur le site était réalisée deux fois par semaine pour s'assurer du bon fonctionnement de l'appareillage. Après l'échantillonnage, les filtres sont mis à sécher pendant 24 heures sous hotte à flux laminaire, puis conservés dans une feuille d'aluminium, elle-même mise dans une pochette plastique, le tout à -20°C.

Pour chaque site, un minimum de 3 blancs de terrain a été effectué. Pour cela, les filtres vierges et grillés ont suivi un protocole identique aux échantillons en restant une semaine dans le magasin du DA-80, mais sans prélèvement.

1.2.3. Données météorologiques

Un capteur de température et pression équipe le DA-80 et a permis d'enregistrer les températures et pressions moyennes journalières. Un anémomètre ultrasonique WMT52 (Vaisala Windcap) était également connecté au DA-80, et a permis d'enregistrer la vitesse et la direction du vent en continu avec un pas de temps de 15 min.

Les données de pluviométrie ont été recueillies sur le site Infoclimat.fr au niveau de la station de Lille-Lesquin, pour Lille et Roubaix (Infoclimat Lille-Lesquin.), la station de Saint-Tricat pour Calais à 8 km de distance (Infoclimat Saint-Tricat.) et la station de Dunkerque (Infoclimat Dunkerque.).

2. Conditions particulières sur les sites de prélèvement

Durant les campagnes de prélèvement, des évènements particuliers ont été enregistrés, soit en lien avec l'évolution de la crise sanitaire liée au COVID, soit pour d'autres raisons (Tableau 7).

- Contexte COVID

Pendant les campagnes menées sur les sites de Lille et Roubaix (entre le 29/09/20 et le 19/11/20), en raison de la pandémie du COVID-19, des mesures de couvre-feu ont été mises en place à partir du 17/10/20 entre 21 h et 6 h, jusqu'au 29/10/20 minuit, date à laquelle un confinement national a été instauré. Ce confinement national a perduré au-delà de la fin des prélèvements sur ces deux premiers sites.

Les campagnes menées sur les sites de Calais et Dunkerque (entre le 21/11/20 et le 14/01/21) ont débuté pendant la période de confinement national. Ce dernier s'est poursuivi

Chapitre 2

Matériels et méthodes

jusqu'au 15/12/20. Suite à cela, un nouveau couvre-feu a pris place de 20 h à 6 h jusqu'au 16/01/21.

- Evènements particuliers

À ceci s'ajoute sur le territoire dunkerquois une explosion et un incendie du dégoudronneur de la cokerie d'ArcelorMittal le 20/11/2020 à 16h20. Cette explosion a entraîné un allumage de plusieurs chandelles de l'aciérie du 20/11/2020 à 16h20 jusqu'au 25/11/2020 à 12h04. ArcelorMittal a également repris son activité à 100 % le 08/12/20 et a redémarré son dernier haut fourneau, le numéro 2, qui avait été arrêté au début de la crise sanitaire. D'autres part, l'entreprise Ascométal aciérie électrique, située à l'Est de Dunkerque, a été fermée du 21/12/20 au 10/01/21, avec du chômage partiel depuis 1 an. La production d'alliage de métal de l'entreprise a été fortement impactée.

Sur le territoire calaisien, des mesures ont été prises sur le Port Boulogne Calais en répercussion de l'augmentation des cas positifs au COVID-19 due au variant dit "anglais", le 21/12/20, notamment pour le transport de passagers. Ceci a entraîné une légère baisse du nombre de ferrys en provenance et en direction du Royaume-Uni (Figure 15).

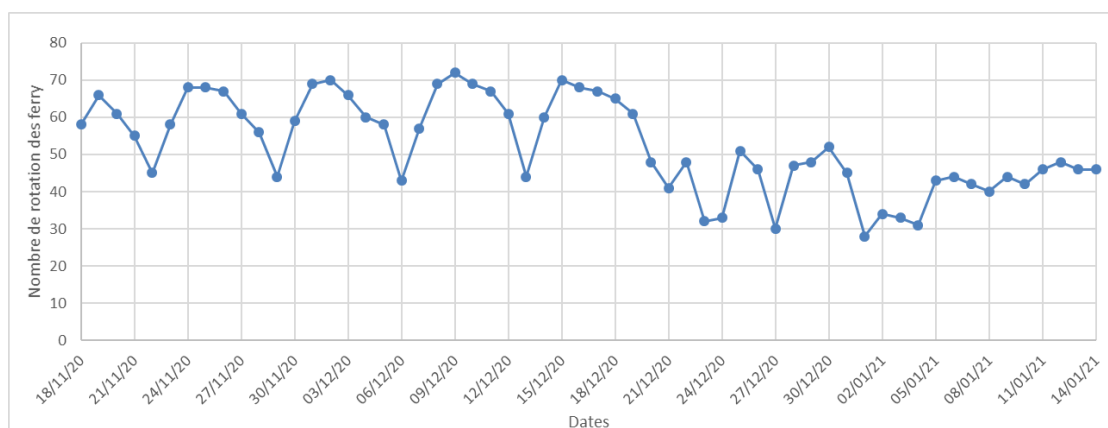


Figure 15 : Nombre de rotations quotidiennes des ferrys dans le Port de Calais au cours de la période d'échantillonnage.

Par ailleurs, le retrait du Royaume-Uni de l'Union Européenne (Brexit) qui a eu lieu le 31/12/20, a provoqué une forte augmentation du trafic routier sur l'autoroute A16. En effet, les semaines précédant cette date, les entreprises anglaises faisant leur stock avant la sortie effective de l'union européenne, amenant un trafic de camions important avec la création de zones tampon sur l'A16. Enfin, des feux d'artifices ont eu lieu à Calais, dans divers endroits de la ville, le 23/12/20. Lors des feux d'artifices il a été montré que les concentrations en certains métaux traces étaient augmentées (Zhang *et al.* 2016).

Tableau 7 : Evènements particuliers ayant eu lieu au cours des prélèvements de particules à Lille et Roubaix (du 29/09/20 au 19/11/20) et à Dunkerque et Calais (du 21/11/20 au 14/01/21) (* : événements liés au COVID-19)

Site	Date/Période	Evènement
Lille et Roubaix	Du 17/10/20 au 29/10/20	*Couvre-feu de 21 h à 6 h
Lille et Roubaix	Du 29/10/20 au 19/11/20	*Confinement national
Dunkerque et Calais	Du 21/11/20 au 15/12/20	*Confinement national
Dunkerque et Calais	Du 15/12/20 au 14/01/21	*Couvre-feu de 20 h à 6 h
Dunkerque	20/11/20	Explosion et incendie du dégoudronneur à la cokerie d'ArcelorMittal
Dunkerque	08/12/20	Redémarrage du Haut Fourneau n°2 d'ArcelorMittal
Dunkerque	Du 21/12/20 au 10/01/21	Fermeture d'Ascométal
Calais	21/12/20	*Mesures sanitaires au Port Boulogne Calais
Calais	31/12/20	Brexit
Calais	23/12/20	Feux d'artifices

Ces phénomènes ont pu avoir un impact sur les niveaux de concentrations en PM_{2.5} et leurs caractéristiques physicochimiques mesurées.

3. Extraction des particules

Les filtres chargés de particules ont été considérés de manière individuelle pour étudier l'évolution chronologique des niveaux de concentration des éléments. Ainsi, chaque filtre de PM_{2.5} a été étudié pour déterminer la concentration en élément majeurs et traces, espèces hydrosolubles et carbone total. Pour l'étude toxicologique, les filtres prélevés ont été regroupés pour obtenir un mix représentatif de chaque site et les particules extraites afin de recueillir les fractions hydrosolubles et organiques de PM_{2.5}. Les cellules pulmonaires ont été exposées à ces extraits.

3.1. Sélection des filtres

Les extractions ont été réalisées sur six sélections différentes de filtres, correspondant à six influences distinctes. Tout d'abord, pour chacun des sites sous l'influence visée (urbaine, trafic routier, maritime et industrielle), nous avons considéré l'ensemble des filtres collectés sur la période pour les extraits. Nous avons pris en compte, de plus, deux sélections de filtres afin d'examiner plus spécifiquement les influences de l'industrie sur le site de Dunkerque et maritime pour le site de Calais. En effet, à la différence des sites de Lille et de Roubaix qui sont sous l'influence des émissions urbaines et du trafic routier toutes directions de vent confondues, les sites retenus à Calais et Dunkerque sont sous l'influences du trafic maritime et de l'industrie uniquement sous certaines conditions de vent. Pour cette raison, il nous est apparu judicieux de cibler ces influences en considérant des sélections de filtres. Ainsi, nous

Chapitre 2

Matériels et méthodes

avons sélectionné une dizaine de filtres (Annexe 1). Plus spécifiquement, en plus du secteur de vent, nous nous sommes basés sur les concentrations en Fe, Pb, Mn, Ca²⁺ et K⁺ pour l'influence industrielle, et celles de V et Ni pour l'influence des fiouls lourd de bateaux. Ces métaux sont en effet connus pour être des marqueurs de ces influences (Kfoury *et al.* 2016 ; Sippula *et al.* 2007). Concernant les sites sous influence urbaine ou du trafic routier, nous pouvons considérer que l'ensemble des filtres est représentatif de cette influence car les sites de prélèvement sont situés au cœur de la ville ou entourés de route, respectivement.

Pour chaque influence, la surface de chacun des filtres considérés pour préparer l'extrait est conditionnée par la quantité de filtre disponible ainsi que le volume et la concentration de la solution d'exposition souhaitée. L'objectif étant d'obtenir des solutions stocks d'un volume de 1 à 2 mL, avec des extraits organiques concentrés à 100 µg.µL⁻¹ et des extraits hydrosolubles à 10 µg.µL⁻¹. Ceci nous a amené à considérer un poinçon circulaire de 47 mm de diamètre et trois poinçons de 19 mm pour chacun des filtres constituant la sélection. Au total, nous avons réalisé 6 extraits hydrosolubles (fraction hydrosoluble des PM) et 6 extraits organiques (fraction organique des PM), correspondant aux influences.

3.2. Conditionnement du matériel d'extraction

Tout le matériel à destination de l'extraction organique a été préalablement placé à l'étuve à 150°C, puis les montages de type Soxhlet sont rincés pendant 4 heures à l'acétone, suivi de 4 heures au n-hexane, et enfin 12 heures au dichlorométhane (DCM). Les flacons permettant la conservation des échantillons ont été traités aux UV afin de les rendre stériles.

Le matériel utilisé pour les fractions hydrosolubles a été préalablement nettoyé avec un solvant organique (DCM ou acétone), puis rincé deux fois à l'eau ultrapure stérilisée. Les flacons sont séchés au four pasteur à 120°C pendant 30 minutes, puis fermés à l'aide de papier aluminium et ruban de stérilisation et replacés au four pasteur pendant 2 heures à 150°C. Ils sont conservés stérilement dans un sachet plastique à usage unique jusqu'à utilisation.

3.3. Extraction de la fraction organique

La fraction organique a été obtenue par extraction de type Soxhlet. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir traiter un gros volume d'échantillons. Les poinçons des filtres sélectionnés ont été placés dans des cartouches en cellulose (Whatmann®). Un échantillon de particules dont les teneurs en HAP sont certifiées (NIST SRM 1648a) a été ajouté avec une masse de particules similaire à celle portée par les poinçons de filtres sélectionnées. Les

cartouches sont placées dans le Soxhlet avec 100 mL de DCM (Pestipur, Merck) (Figure 16-1). Le montage est chauffé à reflux pendant 24 heures et l'extrait obtenu est concentré par évaporation du solvant sous flux d'azote (Figure 16-2) pour atteindre un volume de 1 mL (Figure 16-3).



Figure 16 : Extraction organique des filtres contenant les particules fines.

1 : Montage Soxhlet pour l'extraction des PM_{2.5} dans le dichlorométhane (DCM), 2 : Evaporation du DCM sous azote, 3 : Extraits concentrés dans 1 mL de DCM.

Une partie de l'extrait est conservée à 4°C pour l'analyse des composés organiques. L'autre partie est ensuite mise à évaporer une nouvelle fois sous azote afin d'effectuer un changement de solvant : le DCM a été remplacé par du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour l'étude toxicologique. En effet, le DCM est un composé organique toxique pour les cellules et trop volatil pour être placé à l'incubateur à 37°C. Le DMSO est, quant à lui, toxique à des concentrations plus élevées que le DCM et nous permet donc d'exposer les cellules aux composés organiques dans la limite de 0,2 % de DMSO par échantillon testé. Le volume de

Chapitre 2

Matériels et méthodes

DMSO a été ajusté afin d'atteindre une concentration finale de 100 mg.mL^{-1} . Ils sont ensuite conservés à 4°C .

3.4. Extraction de la fraction hydrosoluble

Afin d'extraire la fraction hydrosoluble, les filtres sont placés dans un volume d'eau ultrapure suffisant pour les recouvrir et mis aux ultrasons. Une fois l'extrait récupéré, il est ensuite lyophilisé afin de concentrer la solution.

De manière plus détaillée, la fraction hydrosoluble a été extraite selon plusieurs étapes bien précises. La sélection de filtres (Figure 17-1) a été placée dans un tube de centrifugation de 100 mL en verre pyrex avec un bouchon en polypropylène (Nalgene) à l'aide d'une pince stérile à usage unique. Sur ces filtres a été ajouté un volume d'eau ultrapure stérile proche de 100 mL (Figure 17-2). Le tube est ensuite mis dans une sonde de cavitation d'ultrasons équipée de 8 transducteurs radiaux (cornet de 13 mm de diamètre, 22 kHz) de SinapTec Ultrasonic Technology (Lezennes, France) (Figure 17-3). La sonde de cavitation est connectée à un analyseur à ultrasons NexTgen afin de surveiller en temps réel l'évolution de l'amplitude, la durée et la température. La température de l'eau interne à la sonde de cavitation d'ultrasons ne doit pas dépasser 40°C afin de ne pas dénaturer les particules et de rester dans des conditions similaires aux conditions physiologiques. Le traitement par ultrasons a été appliqué en mode pulse avec une amplitude à 100 % soit 400 kW. Les échantillons ont été laissés 30 minutes aux ultrasons et ont ensuite été retirés pour être filtrés dans une unité de filtration stérile à usage unique (Nalgene) avec une membrane à $0,2 \mu\text{m}$ (Figure 17-4). Les filtres ont ensuite été compressés en veillant à ne pas rompre la membrane de l'unité de filtration sous vide, pour récupérer un maximum de filtrat.

Le filtrat a ensuite été réparti par portion de 5 mL dans des tubes de lyophilisation de 10 mL. Les filtrats ont alors été mis au congélateur à -20°C pendant une heure puis à -80°C pendant 30 minutes pour ensuite être lyophilisés afin d'obtenir une « poudre » (Figure 17-5). Les échantillons obtenus ont alors été resolubilisés à l'aide de $200 \mu\text{L}$ d'eau ultrapure, leur contenant rincé à nouveau avec $200 \mu\text{L}$ pour être regroupé dans un unique tube de lyophilisation. Une deuxième étape de lyophilisation a été effectuée et le lyophilisat obtenu, représentant la fraction hydrosoluble lyophilisée, a été conservé à 4°C dans un flacon scellé, en attente d'utilisation.

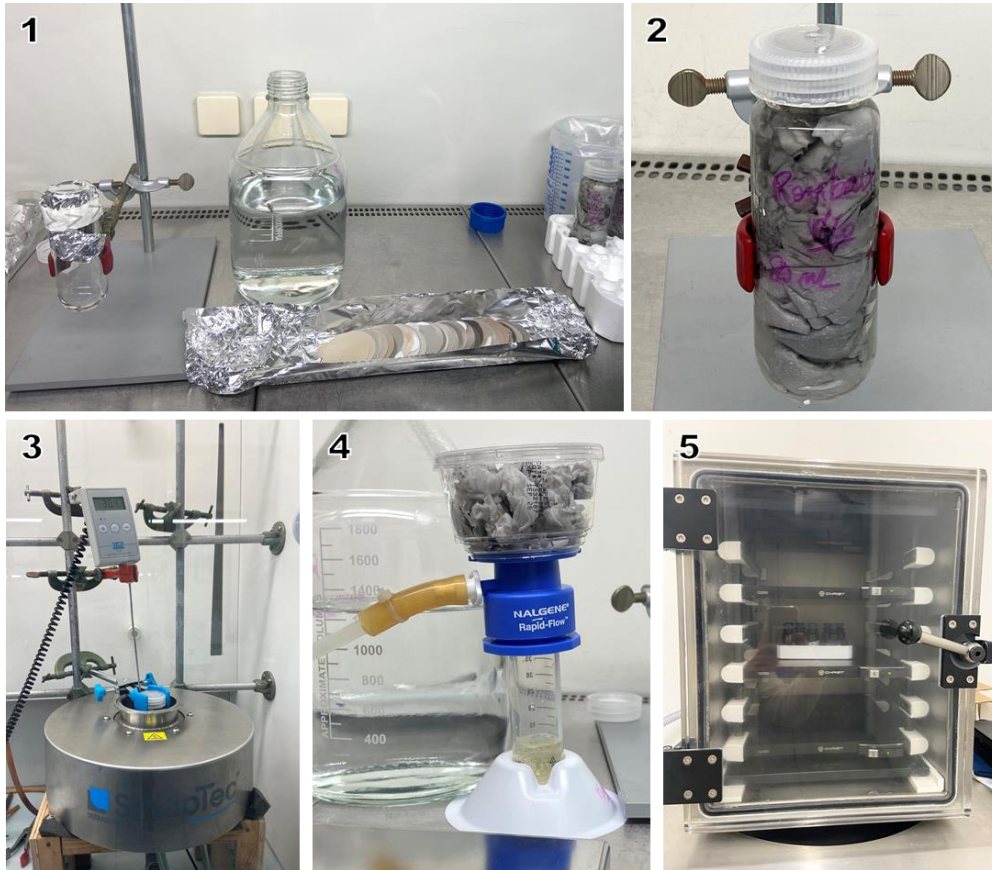


Figure 17: Extraction aqueuse des filtres contenant les particules fines

1 : Poinçons de filtres sélectionnés pour la réalisation de l'extrait aqueux à transférer dans le tube à centrifugation stérile, 2 : tube à centrifugation rempli des poinçons de filtres et d'eau ultrapure, 3 : sonde de cavitation à ultrasons avec tube contenant les échantillons dans la cavité, et un thermomètre, 4 : Unité de filtration stérile contenant dans la partie supérieure les filtres humides et le filtrat dans la partie inférieure, 5 : filtrat réparti dans les tubes à lyophilisation, placé dans le lyophilisateur.

Ainsi, des quantités de lyophilisat comprises entre 4,2 et 18 mg ont été obtenues (Tableau 8). Afin de vérifier l'absence de fibres de quartz dans le lyophilisat et la présence d'ions et de métaux, l'échantillon avec la plus grande masse de particules (l'influence maritime de Calais) a été analysé au microscope électronique à balayage, en chromatographie ionique et en ICP-MS. Ces résultats vont nous permettre d'assurer que les effets cytotoxiques tels que l'inflammation ou le stress oxydant ne sont pas causés par la présence de fibres, mais bien par la présence de particules. Cette étude complémentaire a révélé l'absence de fibres de quartz dans le lyophilisat (Annexe 3), ainsi que la présence de métaux et d'ions (Annexe 2 et Annexe 3). Les lyophilisats sont ensuite remis en suspension dans de l'eau stérile afin d'obtenir des solutions à 10 mg.mL^{-1} .

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Tableau 8 : Quantités de lyophilisat obtenues suite à l'extraction hydrosoluble

Influences des sites	Quantité de lyophilisat (mg)
Maritime	18,0
Industrielle	10,6
Urbaine	6,3
Trafic routier	4,8
Spécifique maritime	5,9
Spécifique industrielle	4,2
SRM 1648a	16,6

4. Analyses chimiques

Au cours de cette étude, 198 échantillons ont été collectés sur quatre sites différents. L'ensemble de ces échantillons (ainsi que les blancs) ont été analysés pour leur teneur en ions hydrosolubles par chromatographie ionique. Les éléments inorganiques majeurs et traces ont également été quantifiés à l'aide des techniques utilisant l'émission atomique : torche à plasma couplée ou non à un spectromètre de masse (ICP-AES et ICP-MS). De plus, les composés organiques ont été analysés par extraits, à l'aide d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse (GC-MS).

4.1. Quantification du carbone total

Le carbone total a été mesuré pour chaque filtre, par le Centre Commun de Mesures (ULCO Dunkerque) à l'aide d'un microanalyseur CHNS Flash 2000 (Thermo Scientific™). Pour cette analyse, environ 1 cm² de chaque filtre de prélèvement a été utilisé. L'appareil utilisé est constitué d'une colonne d'oxydation/réduction placée dans un four chauffé et d'une colonne chromatographique couplée à un détecteur à conductibilité thermique. La portion de filtre placée dans une capsule en étain est introduite dans la colonne d'oxydation sous flux d'hélium à 950°C. De l'oxygène est alors introduit dans la colonne, permettant l'oxydation de l'étain amenant la température entre 1 700 et 1 800°C. A cette température, le carbone présent dans l'échantillon est atomisé, puis oxydé sur la colonne d'oxydation (oxyde de cuivre) et se combine avec l'oxygène présent en excès pour former du CO₂. L'excès d'oxygène est piégé sur une colonne de réduction (cuivre métallique) et le CO₂ est détecté après séparation sur une colonne chromatographique (détecteur à conductibilité thermique).

4.2. Ions hydrosolubles

Les ions hydrosolubles majeurs étudiés sont Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺. Les échantillons sur filtre doivent être extraits pour être analysés dans une solution aqueuse grâce à la chromatographie ionique.

4.2.1. Conditionnement du matériel d'analyse

Tout le matériel à destination de l'analyse des ions a été préalablement nettoyé à l'eau ultrapure (résistivité = 18,2 M Ω .cm). Les flacons à scintillation en polyéthylène destinés à la conservation des extraits ont été rincés trois fois consécutives à l'eau ultrapure, mis sous ultrasons pendant 20 minutes, pour être rincés à nouveau trois fois consécutivement. Les flacons ont ensuite été mis à sécher sous hotte à flux laminaire et enfin conservés dans un sac en plastique à usage unique jusqu'à utilisation.

4.2.2. Extraction des échantillons

Un poinçon de 47 mm de diamètre est placé dans un bécher avec quelques millilitres d'eau ultrapure. Les filtres ont été traités une première fois 20 minutes aux ultrasons à température ambiante. Le lixiviat obtenu est alors récupéré. Le filtre est ensuite rincé à l'eau ultrapure et le lixiviat est de même récupéré. Le processus est répété à trois reprises. Les différents lixiviats regroupés constituent l'extrait aqueux. Il est enfin filtré sur une membrane en acétate de cellulose de porosité 0,45 μ m (VWR[®]), puis conservé à -20°C jusqu'à analyse. Des blancs de préparation (blanc matériel) ainsi que des blancs de filtre ont également été préparés à chaque séance d'extraction afin de vérifier l'absence de contamination extérieure tout au long du processus de prélèvement et de préparation de l'échantillon (Ledoux 2003 ; Ledoux *et al.* 2006).

4.2.3. Chromatographie ionique

L'appareil de chromatographie ionique utilisé était le modèle Dionex ICS 900 (Dionex[®], Thermofischer), couplé à un détecteur conductimétrique DS5, et à un supprimeur électrochimique AERS 500.

Pour l'analyse des anions, l'appareil était équipé d'une colonne AS14A de 4x250 mm ainsi que d'une pré-colonne, où circulait un éluant composé de 1 mM de NaHCO₃ et 8 mM de Na₂CO₃ à un débit de 1 mL.min⁻¹. Pour l'analyse des cations, l'appareil était équipé d'une colonne CS12A de 4x250 mm équipée elle aussi d'une pré-colonne, avec un éluant correspondant à une solution d'acide méthane sulfonique à 18 mM. Le débit était identique à celui utilisé pour les anions, 1 mL.min⁻¹. Les échantillons ont été injectés un à un dans une boucle de 25 μ L. La durée d'analyse pour un échantillon était de 16 minutes.

L'étalonnage a été réalisé à partir de deux solutions mères multi-ions et a permis de couvrir une gamme de 0,25 à 25 mg.L⁻¹.

4.2.4. Limite de détection et validation des résultats

La limite de détection (LDD) a été déterminée à partir des 10 blancs de préparation, et correspond à 3 fois la valeur de l'écart-type. Les LDD sont décrites dans le Tableau 9. Après analyse et traitement des chromatogrammes, nous avons systématiquement comparé les concentrations obtenues à la LDD et avons écarté les résultats sous la LDD. Nous avons également considéré comme valides les échantillons pour lesquels la différence entre l'échantillon et le filtre blanc était supérieure à 1,2 fois l'écart-type sur le filtre blanc.

Tableau 9 : Limites de détection de la chromatographie ionique pour les ions analysés (en mg.L⁻¹)

Ions	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
LDD (mg.L ⁻¹)	0,014	0,008	0,028	0,006	0,024	0,009	0,014	0,019

La validité des concentrations trouvées a pu être vérifiée par calcul de la balance ionique. Cette méthode repose sur la compensation entre charges positives apportées par les cations et des charges négatives apportées par les anions. La balance doit être théoriquement proche de 1 si l'analyse est cohérente et ne néglige aucune espèce. Ici, la balance ionique calculée pour l'ensemble des échantillons est représentée sur la Figure 18.

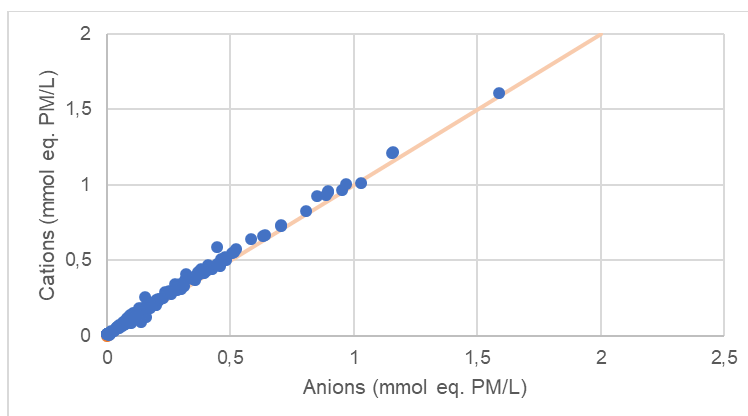


Figure 18 : Balance ionique pour les échantillons de particules prélevés sur l'ensemble des sites (n=225)

Ici, la balance ionique est très proche de 1 (pente de 1,07 ; R²=0,99). Les cations des échantillons sont bien neutralisés par les anions ; le léger déficit en anion pourrait s'expliquer par la présence de carbonates, non quantifiés lors de notre analyse. Nous validons ainsi les résultats obtenus pour l'analyse des ions hydrosolubles associés aux particules prélevées.

4.3. Eléments inorganiques

Un nombre important d'éléments inorganiques ont été quantifiés dans les échantillons prélevés. Pour se faire, l'analyse des éléments majeurs a été effectuée par ICP-AES au sein du Centre Commun de Mesures (ULCO Dunkerque) et celles des éléments traces par ICP-MS au laboratoire de spectroscopie pour les interactions, la réactivité et l'environnement, à l'Institut Michel Eugène Chevreul (Platform of the Research Federation Michel-Eugène Chevreul hosted by the LASIRE laboratory, CNRS FR2638, Villeneuve d'Ascq).

4.3.1. Conditionnement du matériel d'analyse

Tout le matériel à destination de l'analyse des éléments inorganiques a été préalablement nettoyé avec une solution acide (HNO_3/HCl 0,5M/0,5M). Les flacons en polytetrafluoroéthylène (PTFE), qui ont servi à la minéralisation acide des échantillons, ceux en polyéthylène, qui ont servi à leur conservation, ont été rincés au préalable avec la solution de nettoyage acide pendant 48 h. Les flacons ont été mis à sécher sous hotte à flux laminaire et conservés jusqu'à utilisation.

4.3.2. Minéralisation des échantillons

Pour analyser les échantillons, les particules doivent être préalablement mises en solution par minéralisation acide, aussi appelée digestion acide. Pour cela, un poinçon de filtre de 47 mm a été placé dans un flacon en PTFE sur lequel a été ajouté un mélange d'acide $\text{HNO}_3/\text{HF}/\text{HClO}_4$ (4/1/0,5 v/v/v, Suprapur[®], Merck), puis chauffé à 120°C pendant 4 h en utilisant le système DigiPREP MS (SCP Science[®]). Les échantillons ont été évaporés environ 2 h à 170°C jusqu'à obtention d'une gouttelette. Cette dernière est ensuite reprise par quelques millilitres d'eau à 80°C pendant 15 minutes. La solution obtenue après refroidissement est ensuite ajustée à un volume de 13 mL, suffisant pour permettre les deux analyses, et est acidifiée à 1 % par ajout de HNO_3 (Suprapur[®]) pour conservation. Les échantillons ont été filtrés sur des membranes en acétate de cellulose de porosité 0,45 μm (VWR[®]) avant d'être stockés à -20°C jusqu'à analyse.

4.3.3. ICP optique

L'appareil utilisé pour l'analyse par ICP-AES est le modèle iCAP série 6000 (ThermoScientific), équipé d'un nébuliseur en quartz. Les éléments étudiés sont Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, S, Sr, Ti et Zn. Tous les échantillons ont été analysés en triplicats en

Chapitre 2

Matériels et méthodes

mode visée axiale afin de bénéficier d'une sensibilité accrue, en se basant sur une ou deux longueurs d'onde présentées dans le Tableau 10. Les solutions étalons ont été préparées à partir d'une solution multi-éléments et couvrent les gammes de concentrations décrites dans le Tableau 10. L'étalonnage est réalisé à chaque début de séance, et un étalon est analysé tous les 10 échantillons pour s'assurer qu'aucune dérive de l'appareillage intervient durant l'analyse.

Tableau 10 : Gamme de concentrations des éléments d'étalonnage, longueur d'onde et limite de détection de ces éléments

Eléments	Gamme d'étalonnage (µg.L ⁻¹)	Longueur d'onde (nm)	Limite de détection (µg.L ⁻¹)
Al	50 – 20 000	396,152	1,98
Ba	0,5 – 200	455,403	0,06
Ca	50 – 20 000	393,366	3,33
Cu	5 – 2 000	324,754	0,37
Fe	50 – 20 000	259,940 ; 238,204	0,93
K	50 – 20 000	769,896	4,16
Mg	50 – 20 000	279,553 ; 280,270	0,19
Mn	5 – 2 000	257,610	0,10
Na	50 – 20 000	589,592	0,80
S	50 – 20 000	182,034	13,49
Sr	0,5 – 200	407,771	0,03
Ti	5 – 2 000	334,941 ; 323,452	0,44
Zn	5 – 2 000	213,856	0,24

La limite de détection a été calculée à partir des valeurs de concentrations obtenues pour les blancs analytiques et leurs écart-types, lors de chaque minéralisation, selon la formule : $LDD = 3 \times \text{écart-type}$

4.3.4. ICP-MS

L'appareil utilisé pour l'ICP-MS est le modèle Agilent 7 900 (Agilent) équipé d'une cellule de collision (He a été utilisé comme gaz de collision pour limiter les interférences). Les éléments étudiés sont Ag, As, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, La, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Tl, et V. Tous les échantillons ont été analysés en triplicats en présence d'un étalon interne, le ¹⁸⁵Re. Cet élément ne se trouve pas naturellement dans l'environnement et ne peut donc pas être

retrouvé dans l'échantillon. Il permet ainsi de s'assurer de l'uniformité des analyses et de tenir compte d'une dérive éventuelle de l'appareillage au cours de la séquence d'analyse.

La gamme d'étalonnage, couvre une plage de concentrations allant de 0,1 à 100 ppb.

4.3.5. Validation des résultats

Les méthodes de préparation des échantillons et la justesse de la quantification des éléments inorganiques a été validée en minéralisant puis analysant l'échantillon certifié « Urban Particulate Matter » NIST SRM 1648a (NIST Standard Reference Material® 1648a). Les éléments du SRM et leurs quantités sont connues et doivent avoir un taux de recouvrement proche de 100 % pour que la méthode soit validée.

Tableau 11 : Taux de recouvrement en pourcentage de l'échantillon certifié SRM 1648a pour l'ICP AES

Eléments	Al	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Sr	Ti	V	Zn
Taux de recouvrement (%)	98	68	96	96	94	98	97	97	90	103	90

Tableau 12: Taux de recouvrement en pourcentage de l'échantillon certifié SRM 1648a pour l'ICP MS

Eléments	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	V
Taux de recouvrement (%)	107	104	97	71	96	106	95	122	118

Pour notre étude, tous les éléments ont un excellent taux de recouvrement (entre 90 et 107%), à l'exception du chrome qui possède un taux de recouvrement proche de 70 % et le vanadium et l'antimoine proche de 120 % (Tableau 11 et Tableau 12). Cr est connu pour montrer un taux de recouvrement de cet ordre (Alleman *et al.* 2010 ; Ledoux *et al.* 2017).

4.4. Étude des composés organiques

Les composés organiques ont été quantifiés après extraction des filtres chargés de particules au DCM, comme décrit en 3.3 (p. 66). Pour cette analyse nous avons utilisé une fraction de l'extrait réalisé avant l'étape de changement de solvant. Les teneurs en HAP, dérivés nitro-HAP et oxy-HAP, en phtalates et en alcanes ont été étudiées.

4.4.1. Analyse par GC-MS

Les appareils utilisés était un chromatographe phase gaz couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) à impact électronique (1200 TQ, Varian, USA) (GC-MS EI), ainsi qu'un GC 7890B couplé à un MS 7000D (Agilent Technology, USA) à ionisation chimique négative

Chapitre 2

Matériels et méthodes

(GC-MS NCI). Les composés étudiés par GC-MS EI sont les HAP, et les composés étudiés par GC-MS NCI sont les dérivés oxy- et nitro-HAP, tous décrits dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Hydrocarbures aromatiques polycycliques étudiés par GC-MS

HAP	Nitro-HAP	Oxy-HAP
Naphtalène	1-nitronaphtalène	9-Fluorenone
Acénaphtylène	2-nitronaphtalène	9,10-Anthraquinone
Acénaphène	2-méthyl-1-nitronaphtalène	Benzo(a)fluorenone
Fluorène	2-nitrofluorène	7H-benz(de)anthracèn-7-one
Phénanthrène	6-nitrobenzo(a)pyrène	Benz(a)anthracèn-7,12-dione
Anthracène	6-nitrochrysène	
Fluoranthène	7-nitrobenz(a)anthracène	
Pyrène	3-nitrofluoranthène	
Benzo(a)anthracène	1-nitropyrène	
Chrysène	1,8-dinitronaphtalène	
Benzo(b)fluoranthène	1,5-dinitronaphtalène	
Benzo(k)fluoranthène	1,3-dinitronaphtalène	
Benzo(a)pyrène	9-nitroanthracène	
Indeno(1,2,3-c,d)pyrène	3-nitrophénanthrène	
Dibenz(a,h)anthracène	2-nitroanthracène	
Benzo(g,h,i)perylène	1,8-dinitropyrène	
Benzo(e)pyrène		
Dibenzo(a,e)pyrène		
Dibenzo(a,i)pyrène		

De plus les composés organiques suivants ont été analysés par GC-MS EI : diméthyl phtalate, diéthyl phtalate, dibutyl phtalate, benzyl butyl phtalate, bis(2-ethylhexyl) phtalate, di-n-octyl phtalate ; le bisphénol A et les alcanes allant de C₁₁ à C₄₀.

4.4.2. Validation de la méthode d'extraction et d'analyse

La validation de la méthode d'extraction des échantillons et d'analyse des HAP et des autres composés, repose sur l'analyse de l'échantillon certifié SRM 1648a (NIST Standard Reference Material® 1648a). Cet échantillon possède des teneurs en HAP connues. Ainsi le taux de recouvrement des teneurs des échantillons extraits, par rapport aux valeurs certifiées, est compris entre 86 et 127 % avec la majorité des valeurs aux alentours de 100 %. Ces résultats sont donc très satisfaisants et permettent de valider la méthodologie d'extraction et d'analyse des échantillons pour leur teneur en HAP.

4.5. Étude des endotoxines

Les particules fines atmosphériques sont également composées d'une fraction biologique. Cette fraction peut impacter la toxicité induite par les particules, avec notamment une activation importante de la réponse inflammatoire (Cavaillon 2018 ; Soukup et

Becker 2001). Cette fraction peut être étudiée sur des filtres fraîchement prélevés, à l'aide de matériel de culture microbiologique. Ne disposant pas de ce type de matériel au laboratoire, nous avons trouvé une autre alternative afin de quantifier cette fraction biologique.

Il est possible d'étudier les endotoxines lipopolysaccharides, soit la membrane des bactéries gram négatives, dans la fraction hydrosoluble des particules. Cette analyse se fait à partir du kit Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (ThermoFischer). Les tests ont été réalisés en triplicats.

Les concentrations en endotoxines, exprimées en unité d'endotoxines par m³ sont regroupées dans le Tableau 14. Les concentrations d'endotoxines les plus importantes sont retrouvées dans les extraits correspondant aux influences spécifiques « industrielle » et « maritime ». Pour les extraits initiaux, l'influence industrielle semble contenir la concentration la plus élevée d'endotoxines. Notons toutefois que les concentrations en endotoxines trouvées dans les extraits hydrosolubles sont 1000 fois inférieures aux concentrations d'endotoxines retrouvées dans certaines zones urbaines et rurales (Rolph *et al.* 2018).

Tableau 14 : Concentration des extraits hydrosolubles en endotoxines (UE.m⁻³)

Influences	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic routier	Spécifique Maritime	Spécifique Industrielle
Quantité d'endotoxines (UE.m ⁻³)	0,00042	0,00073	0,00030	0,00023	0,00087	0,0011

5. Potentiel oxydant

Les tests d'évaluation du potentiel oxydant sont des tests acellulaires qui sont utilisés afin d'estimer la capacité des particules à générer des espèces réactives de l'oxygène et/ou oxyder les antioxydants (Moufarrej *et al.* 2020). Plusieurs méthodes existent dans la littérature pour l'évaluation de ce paramètre, qui se basent sur le suivi de différentes réactions chimiques ou espèces réactives (Crobeddu *et al.* 2017). Ces tests ne remplacent pas les méthodes cellulaires mais pourraient établir une tendance dans la réponse au stress oxydant (Øvrevik 2019).

Dans le cadre de ce travail, l'évaluation du potentiel oxydant va être réalisée par les tests à l'acide ascorbique (AA) et au dithiothréitol (DTT) selon la méthodologie de Moufarrej *et al.* (2020). L'acide ascorbique est considéré comme un antioxydant qui empêche l'oxydation des lipides et des protéines tandis que le DTT est considéré comme un substitut chimique des réducteurs intracellulaires.

Dans les deux cas, la 1,4-naphtoquinone est utilisée comme témoin positif.

5.1. Test à l'acide ascorbique

Le test à l'acide ascorbique consiste à suivre la cinétique de disparition de l'acide ascorbique (un antioxydant présent dans le fluide pulmonaire) une fois en contact avec les extraits de particules. Le suivi se fait pendant 2 heures par mesure de l'absorbance à 265 nm.

Pour cela, la mesure est effectuée dans une plaque transparente aux UV à fond plat (UV-Star® 655801, Greiner bio-one). Dans chaque puits sont disposés les échantillons d'extraits de particules (160 µL) en triplicats et incubés pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, 40 µL de solution d'AA (préparée dans un tampon phosphate : PBS) sont ajoutés dans les puits, agités pendant 1 minute puis lus à 265 nm toutes les 2 minutes pendant 2 heures.

La concentration en AA diminue en fonction du temps et la pente de la partie linéaire de cette courbe permet alors de déterminer la valeur de potentiel oxydant. Les valeurs de potentiel oxydant sont normalisées par rapport à la masse de PM estimée dans les extraits organiques et hydrosolubles ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$).

5.2. Test au dithiothréitol

Pour le test au dithiothréitol, on suit la consommation du DTT, lors de son oxydation par les espèces chimiques des extraits de particules à différents instants. Toutefois, le DTT est un composé qui n'absorbe pas de longueur d'onde dans le domaine des UV ou du visible. Le DNTB (dithiobis(2-acide nitrobenzoïque)) est alors utilisé car la réaction entre le DTT et le DNTB résulte en un composé coloré, le TNB (acide 2-nitro-5-sulfanylbenzoïque). Son absorbance est mesurée à 412 nm, et permet de suivre la quantité de TNB qui est proportionnelle à la quantité de DTT restante.

Ainsi, 40 µL d'extraits de particules et 120 µL de tampon phosphate sont déposés dans une plaque 96 puits noire à fond transparent (Costar® 3631, Corning USA) en triplicats. Après 10 minutes d'incubation sous agitation à 37°C, 25 µL de DTT (0,4 µM préparé dans du PBS) sont ajoutés dans chaque puits afin de démarrer la réaction d'oxydation. Après des temps spécifiques d'incubation à 37°C avec le DTT (0, 5, 10, 20, 30, 45 et 60 minutes), 15 µL de DNTB (1,5 mM préparé dans le PBS) sont ajoutés dans chaque puits pour convertir le DTT restant en DNTB. 10 minutes après l'ajout du dernier DNTB, la plaque est mesurée à 412 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Varioskan™, ThermoFischer). Les concentrations en DTT sont converties grâce à la courbe de calibration de 1,4-napthoquinone et comparées aux blancs.

Une courbe montrant l'évolution de la concentration du DTT en fonction du temps peut être tracée. La pente de la partie linéaire de la courbe nous permet de déterminer la valeur de potentiel oxydant. Les valeurs du potentiel oxydant sont normalisées à la masse de particules estimée dans les extraits organiques et hydrosolubles.

6. Culture des cellules pulmonaires

6.1. Modèles cellulaires

Deux modèles cellulaires ont été choisis pour ces travaux : les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B ainsi que la lignée alvéolaire A549. Ces deux modèles sont couramment utilisés pour l'étude des effets des PM_{2.5}. Ils ont tous deux des propriétés inflammatoires et métaboliques essentielles à l'étude pour l'exposition aux xénobiotiques. Toutefois, comme expliqué dans l'étude bibliographique (Chapitre 1-7.2.1), seules les cellules A549 sont pertinentes pour l'étude de la TEM. En effet, les cellules BEAS-2B possèdent des caractéristiques mésenchymateuses de manière constitutive.

6.1.1. Cellules BEAS-2B

Les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B proviennent de l'European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) sous la référence ATCC® CRL-9609. Elles ont été isolées lors d'une autopsie d'un donneur sain, et ont été transformées par un adénovirus hybride 12-SV40, puis clonées.

6.1.2. Cellules A549

La lignée alvéolaire A549 provient également de l'ECACC sous la référence ATCC® CCL-185. Ces cellules ont été isolées d'un patient âgé de 58 ans, atteint d'un adénocarcinome pulmonaire, et n'ont donc pas subi de modification visant à les rendre immortelles.

6.2. Culture des modèles cellulaires

Le travail bibliographique a permis de démontrer que le milieu à utiliser pour les BEAS-2B était le milieu LHC-9, sans supplément sur des supports CellBind® (Corning).

La culture des cellules A549 se fait dans le milieu F12-K supplémenté de SVF pour une concentration finale de 10 %.

Les cellules sont décollées avec 0,25 % de trypsine et 0,5 % de polyvinylpyrrolidone pour éviter la formation d'agrégats de cellules, jusqu'à leur détachement complet, pour ensuite être remises en culture dans les conditions optimales, à 37°C dans des conditions humides avec 5 % de CO₂. Le milieu de culture doit être renouvelé tous les 3-4 jours. La confluence des cellules ne doit pas dépasser les 80%.

6.3. Exposition cellulaire

Les cellules épithéliales pulmonaires seront exposées pendant 24, 48 et 72 heures avec les 12 fractions afin de déterminer leur cytotoxicité, et la CL₁₀ en particulier. Les concentrations d'exposition sont exprimées en µg d'équivalent PM.cm⁻² (µg eq PM.cm⁻²).

L'étude des mécanismes de cytotoxicité connus pour être induits par les particules fines est réalisée sur le même type de cellules, exposées pendant 6 h à 48 h à des concentrations inférieures et égales à la CL₁₀.

Pour l'étude de la TEM, les temps d'expositions seront plus longs, allant de 72 h à 7 jours (expositions subaiguës).

Dans tous les cas, des témoins positifs et négatifs seront considérés.

Afin de mettre en culture les cellules BEAS-2B et A549, nous nous sommes basés sur d'autres travaux du laboratoire pour avoir la concentration optimale d'ensemencement selon les temps d'exposition. Pour évaluer la concentration optimale, il faut que la morphologie et le développement des cellules reste inchangée et que la confluence ne dépasse pas 80 % à la fin de la durée d'exposition.

6.3.1. Exposition aiguë in vitro

L'exposition aiguë se caractérise par la courte durée de l'exposition. Nous considérons que l'exposition aiguë se limite aux premières heures d'exposition jusqu'à 72 heures (non incluses). Ainsi, pour l'exposition aiguë, les cellules seront exposées au minimum 6 h jusqu'à 48 h. Pour les expositions de 6 à 48 h, les cellules sontensemencées à des concentrations comprises entre 50 000 et 100 000 cellules.cm⁻².

6.3.2. Exposition subaiguë in vitro

L'exposition subaiguë se caractérise par une durée de contact des cellules avec le toxique plus longue que l'exposition aiguë. *In vitro*, l'exposition subaiguë signifie au-delà de 72 h, et pour cette thèse jusqu'à 7 jours d'exposition. Pour des expositions de 72 h à 7 jours, les cellules A549 sontensemencées à 10 000 cellules.cm⁻².

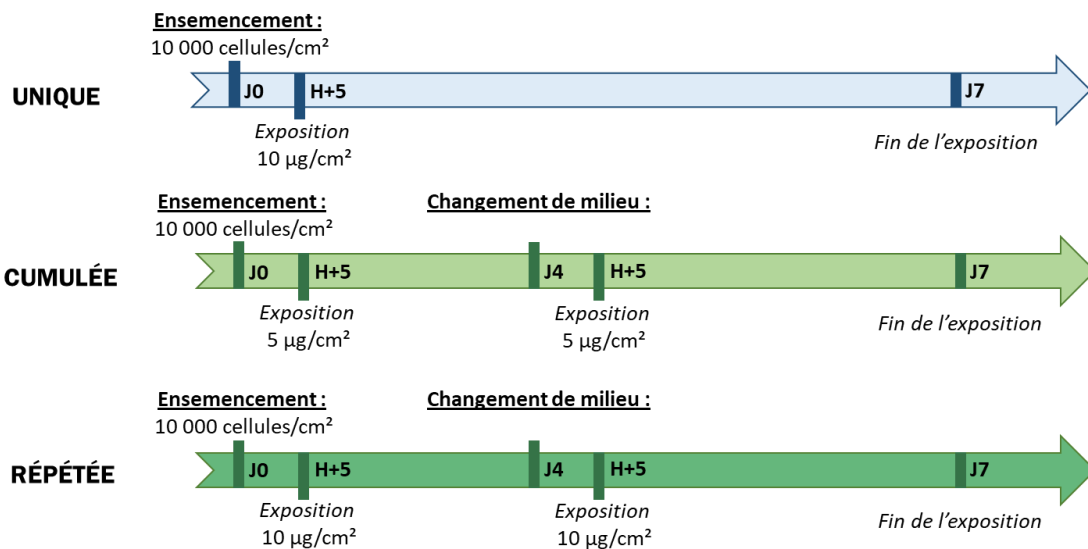
Afin de vérifier la faisabilité de l'étude pour une exposition de 7 jours, plusieurs possibilités d'expositions ont été testées :

- L'exposition continue : 7 jours sans repiquage, avec ou sans changement de milieu à J4,

- L'exposition discontinue : 7 jours avec un repiquage à J4 et une nouvelle exposition après l'adhésion des cellules.

Pour l'optimisation, des cellules A549 ont été exposées aux extraits organiques et hydrosolubles de particules SRM 1648a à $10 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ en dose « unique » ($10 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ à J0 sans repiquage ni changement de milieu), en dose « cumulée » ($5 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ à J0 + $5 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ à J4 avec repiquage ou changement de milieu) ou en dose « répétée » ($10 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ à J0 + $10 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ à J4 avec repiquage ou changement de milieu) (Figure 19).

Expositions continues :



Expositions discontinues :

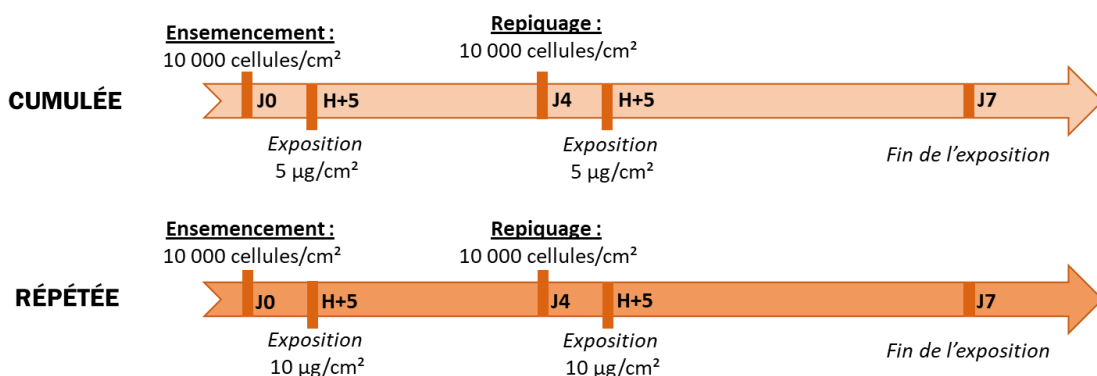


Figure 19 : Différents scénarii d'exposition sur 7 jours pour une dose finale à $10 \mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}$: continues et discontinues en doses unique, cumulées ou répétées

L'exécution de ces tests a montré qu'il était possible de cultiver les cellules sur 7 jours sans changement de milieu de culture à J4. La méthode utilisant l'exposition unique n'a montré aucune modification du pH du milieu de culture sur les 7 jours, ni d'augmentation de mort cellulaire, ni de modifications morphologiques. Cette méthode étant également la plus simple

Chapitre 2

Matériels et méthodes

pour la définition de la dose d'exposition, elle sera utilisée par la suite pour les expositions subaiguës.

6.3.3. Témoins positifs et négatifs

Pour l'intégralité des tests de cytotoxicité et de TEM, des témoins sont réalisés tels que des témoins contenant le milieu sans cellule, le milieu sans cellule avec la concentration maximale de toxique (solution d'extrait de particules hydrosolubles ou organiques), des cellules dans du milieu seul et des cellules dans du milieu contenant le solvant organique (le DMSO) utilisé pour les extraits de la fraction organique à la concentration maximale, à une concentration ne dépassant jamais 0,2 % (Tableau 15).

Suivant les différents tests effectués, des témoins positifs seront utilisés pour s'assurer du bon fonctionnement cellulaire. Ainsi sont utilisés, pour l'étude de l'inflammation, une concentration de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de lipopolysaccharides (LPS) bactérien ; pour l'étude du stress oxydant, $200 \mu\text{M}$ de H_2O_2 frais ; pour l'étude de la métabolisation des composés organiques, $100 \mu\text{M}$ de BaP et pour l'étude de TEM le TGF- β à 10 ng.mL^{-1} (Tableau 15).

Tableau 15 : Ensemble des témoins positifs et négatifs utilisés au cours des expérimentations de toxicologie

	Témoins	Composés	Concentrations
Ø cellules	Pas de cellules	Milieu de culture	-
	Composé testé	Milieu de culture + extrait de $\text{PM}_{2.5}$	Concentration maximale testée
Avec cellules	Milieu seul	Milieu de culture	-
	Solvant organique	DMSO	0,2 %
	Témoin de mort cellulaire	Triton X-100	2 %
	Témoin positif inflammation	LPS	$2 \mu\text{g.mL}^{-1}$
	Témoin positif stress oxydant	H_2O_2	$200 \mu\text{M}$
	Témoin positif métabolisation	BaP	$100 \mu\text{M}$
	Témoin positif TEM	TGF- β	2 ng.mL^{-1}

7. Réponse cellulaire suite à l'exposition aux extraits de particules

La mortalité, la viabilité et la prolifération cellulaire des extraits de PM_{2.5} ont été testés ainsi que les différents mécanismes pouvant induire la cytotoxicité. Ainsi, des réactions tels que l'inflammation, le stress oxydant et la métabolisation des composés organiques ont également été étudiées.

7.1. Cytotoxicité des extraits de PM_{2.5}

Les résultats de cytotoxicité vont permettre de déterminer les doses d'exposition des deux types cellulaires aux fractions organiques et hydrosolubles des particules. Ces tests vont étudier l'induction de mortalité et les changements de viabilité et de prolifération cellulaire suite à ces expositions. En effet, les PM_{2.5} sont connues pour induire la mort cellulaire sans rupture membranaire, ce qui pourrait remettre en cause les résultats de mortalité cellulaire avec uniquement la lecture des résultats de quantification de lactate déshydrogénase extracellulaire. La multiplication des tests de cytotoxicité permettra ainsi d'assurer l'absence de résultats faux négatifs et l'obtention de résultats robustes. Chaque méthode a été effectuée en amont avec un extrait d'échantillon de particules certifiées 1648a afin de vérifier la faisabilité du test. De plus, chaque échantillon est effectué en triplicat. Les résultats de ces tests vont permettre l'obtention des concentrations létales 50 (CL₅₀) et 10 (CL₁₀), et la CL₁₀ sera utilisée par la suite pour l'étude des mécanismes de toxicité et de TEM.

7.1.1. Evaluation de la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire peut être caractérisée par différents procédés biologiques, et notamment la rupture membranaire des cellules. Cette rupture conduit à la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. La mortalité cellulaire peut donc être évaluée grâce au kit Cytotoxicity Detection LDH (Roche Diagnostic, Merck-Milipore) qui utilise la capacité de cette enzyme à réagir avec le sel de tétrazolium (jaune) pour former du formazan (rouge). La quantité de formazan formé est ainsi proportionnelle à la quantité de cellules mortes.

Toutefois, la LDH se dégrade très vite et n'est plus visible dans le surnageant de culture dès 3 jours après le début de l'exposition. Afin de quantifier la LDH lors d'une exposition longue, il faut, dans l'idéal, récupérer le milieu de culture avant sa dégradation. De plus, la LDH est naturellement présente dans le SVF utilisé en complément au milieu des cellules A549, induisant un niveau intrinsèque de base beaucoup plus élevé pour les A549 que pour les BEAS-2B, cultivées sans sérum. La comparaison intercellulaire est donc impossible avec

Chapitre 2

Matériels et méthodes

ces deux modèles pour la mesure de la LDH. Il est également important que les mesures soient réalisées le plus rapidement possible une fois les prélèvements effectués pour éviter la dégradation de l'enzyme qui ne se conserve pas à -20°C.

La mesure de la LDH est réalisée pour les deux types cellulaires dans 100 µL de surnageant de cellules exposées et témoins. Cette mesure est effectuée directement à la fin de l'exposition, sans conservation des échantillons. Des témoins négatif et positif ont été réalisés, le premier uniquement avec des cellules et du milieu de culture, le deuxième à partir de cellules auxquelles est ajoutée une solution de Triton X-100 2% final (v/v) qui dégrade la membrane plasmique et libère la LDH dans le surnageant. Le réactif de détection est ajouté sur le surnageant et tous deux sont incubées entre 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. La densité optique de la solution contenue dans les puits de la plaque 96 puits est mesurée à 490 et 600 nm avec un lecteur de plaques (Varioskan™, Thermo Fischer). La longueur d'onde de 600 nm permet de corriger la première absorbance des éventuelles bulles contenues dans les puits. La cytotoxicité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}}}{\text{Abs}_{\text{témoin positif}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}}} \times 100$$

Avec $\text{Abs}_{\text{échantillon}}$ comme étant l'absorbance corrigée de la solution contenue dans chaque puit d'échantillon, $\text{Abs}_{\text{témoin négatif}}$ l'absorbance corrigée de la solution du témoin cellules seules, et $\text{Abs}_{\text{témoin positif}}$ l'absorbance corrigée de la solution du témoin avec les cellules et le triton X-100. La mortalité est exprimée en pourcentage.

7.1.2. Evaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test CellTiter-Glo® (Promega) qui quantifie l'ATP présent dans les cellules. L'ATP étant présente dans toutes les cellules vivantes, elle permet de témoigner le bon fonctionnement des cellules, y compris les cellules quiescentes et sénescents. L'ATP va oxyder la luciférine du kit en oxy-luciférine luminescente. L'intensité du signal luminescent est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans les cellules, et donc au nombre de cellules viables présentes dans le milieu de culture. Après exposition des cellules aux extraits de PM_{2.5}, 100 µL de la solution CellTiter-Glo® reagent sont ajoutés aux 100 µL de milieu de culture sur les cellules adhérentes. Les témoins positifs et négatifs sont alors inversés par rapport à ceux de l'évaluation de la mortalité cellulaire. Ainsi, des témoins positifs non exposés et négatifs de cellules lysées au tritonX-100 sont réalisés. Le contenu de la plaque est homogénéisé pendant 2 minutes, et transféré dans une plaque blanche opaque

pendant 10 minutes pour enfin lire la luminescence des échantillons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité selon l'équation suivante :

$$\text{Viabilité (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}}}{\text{Abs}_{\text{témoin positif}} - \text{Abs}_{\text{témoin négatif}}} \times 100$$

Avec $\text{Abs}_{\text{échantillon}}$ comme étant l'absorbance corrigée de la solution contenue dans chaque puits d'échantillon, $\text{Abs}_{\text{témoin négatif}}$ l'absorbance corrigée de la solution du témoin cellules et le triton X-100, et $\text{Abs}_{\text{témoin positif}}$ l'absorbance corrigée de la solution du témoin avec les cellules seules. La viabilité est exprimée en pourcentage.

7.1.3. Evaluation de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire, c'est-à-dire la capacité des cellules à se diviser et se multiplier, est mesurée grâce au test AlamarBlue™ (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). Cette méthode se base sur la capacité de la résazurine, une molécule bleue peu fluorescente, à être convertie par les mitochondries en résorufine, molécule rose fluorescente. La concentration en résorufine métabolisée est proportionnelle au nombre de cellules fonctionnelles.

La méthode a été optimisée au laboratoire où 10 µL de solution réactionnelle ont été ajoutés sur les cellules exposées dans 90 µL de milieu de culture. Après une incubation de 2 h à 37°C dans l'obscurité, la densité optique de la solution dans les puits de la plaque a été mesurée à 570 et 600 nm à l'aide du lecteur de plaque (Varioskan™, ThermoFischer). Les résultats sont exprimés en index de prolifération normalisé par rapport au témoin.

7.2. Étude des mécanismes de toxicité induits par les PM_{2.5}

L'étude de la cytotoxicité a permis d'obtenir les doses de CL₁₀, soit 10 µg eq PM.cm⁻². Cette concentration ainsi qu'une concentration 10 fois inférieure, seront utilisées pour l'étude des mécanismes de toxicité.

7.2.1. Évaluation de l'expression génique par RT-qPCR

Pour quantifier l'expression génique à partir de cultures cellulaires, une extraction de l'ARNm est nécessaire. Pour cela, un kit nous permet d'extraire directement l'ARN à l'aide de colonne d'affinité, le kit peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (VWR Life Science®). Cette méthode comprend plusieurs phases d'éluion et de purification du matériel cellulaire. Les cellules exposées conservées jusqu'alors à -80°C sont décongelées et lysées avec une

Chapitre 2

Matériels et méthodes

solution de lyse. Le tout est homogénéisé et centrifugé à 14 000 g pendant 2 minutes, puis transféré afin d'être précipité à l'éthanol 70 %. Le lysat est transféré dans une colonne qui fixe l'ADN. Plusieurs étapes d'élution et purification permettent de purifier l'ARN qui sera quantifié à l'aide d'une plaque μ dropTM (ThermoFischer) avec plusieurs mesures de la densité optique : à 230, 260 et 280 nm. Ainsi, la lecture à 260 nm permet d'évaluer la quantité d'ARN, le ratio 260/280 nm quantifie la contamination par les acides nucléiques et par des protéines, et le ratio 260/230 permet d'évaluer les contaminations par les molécules des solutions d'extraction comme les phénols, l'EDTA et les ions guanidinium. Une fois quantifiée, l'ARN est stocké à 80°C si nécessaire.

L'ARN obtenu va ensuite être retro-transcrit par la reverse transcriptase (RT) afin d'obtenir l'ADNc nécessaire à l'étape de réaction de polymérisation quantitative en chaîne (qPCR). Pour cela, 1 μ g d'ARNm suffit à synthétiser l'ADNc dans un volume total de 45 μ L avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, ThermoScientific) selon le protocole du fabricant. La transcription inverse a été réalisée dans un thermocycleur SimpliAmp (Applied Biosystems). Le programme de RT comprend l'hybridation des amorces pendant 10 minutes à 25°C, puis la rétrotranscription de l'ARNm en ADNc pendant 120 minutes à 37°C, et enfin l'inactivation de l'enzyme pendant 5 minutes à 85°C. L'ADNc est conservé à 4°C dans l'attente de la réalisation des qPCR.

L'expression génique a été quantifiée à l'aide du kit TaqMan[®] Advanced Master Mix et des amorces TaqMan[®] Assay (Tableau 16). Pour chaque échantillon, 10 ng d'ADNc ont été utilisés en triplicat dans un volume final de 10 μ L. La réaction de qPCR a été effectuée en utilisant un thermocycleur Quant Studio 3 (Applied Biosystems, ThermoScientific). Le programme comprend une succession de 40 cycles, divisés en 3 périodes : la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 20 secondes, l'hybridation des amorces et de la sonde à 60°C, et l'élongation à 72°C pendant l'augmentation de la température entre 60°C et 95°C, qui permet la libération de la sonde fluorescente FAM. Une amorce avec une sonde fluorescente VIC a été utilisée en multiplexage, l'amorce pour CYP1B1. Des tests préliminaires ont été réalisés afin de s'assurer de l'absence de perte de signal entre le simplex et le multiplex, afin de s'assurer de la bonne évaluation de la quantité d'ADNc (Annexe 4).

Les résultats obtenus sur le logiciel Quant StudioTM Design and Analysis sont sous forme de C_q (cycle de quantification). Ces cycles de quantification correspondent au nombre de cycles d'amplification effectués pour atteindre une intensité de fluorescence significativement supérieure au bruit de fond. Les C_q sont analysés par la méthode de $\Delta\Delta C_q$ en utilisant les cellules non-exposées comme référence (Livak et Schmittgen 2001). La normalisation du niveau d'expression des gènes d'intérêt a été effectuée grâce au gène de

référence de l'ARN ribosomal 18s. Les résultats finaux sont exprimés en quantité relative (RQ), qui correspond au niveau d'expression du gène dans les cellules exposées par rapport aux cellules témoins non-exposées. Ainsi des seuils de significativité sont pour des valeurs de $RQ \geq 2$ et $\leq 0,5$. Chaque échantillon a été réalisé en deux réplicats biologiques et deux réplicats techniques.

Tableau 16 : Références des amorces TaqMan utilisées pour les qPCR

	Gènes cibles	Abréviations	Référence amorces
Gène de référence	ARN ribosomal 18s	18s	Hs99999901_m1
Inflammation	Interleukine-6	IL-6	Hs00174131_m1
	Tumor necrosis factor- α	TNF- α	Hs01113624_g1
	Interféron- γ	IFN- γ	Hs00989291_m1
	Interleukine-1 β	IL-1 β	Hs00174097_m1
Stress oxydant	NAD(P)H quinone oxygénase 1	NQO1	Hs00168547_m1
	Catalase	CAT	Hs00156308_m1
	Superoxyde dismutase 1	SOD1	Hs00533490_m1
	Superoxyde dismutase 2	SOD2	Hs00167309_m1
	Hème oxygénase 1	HMOX1	Hs01110250_m1
Métabolisation des composés organiques	CYP450 1A1	CYP1A1	Hs01054796_m1
	CYP450 1B1	CYP1B1	Hs00164383_m1
	CYP450 3A4	CYP3A4	Hs00604506_m1
	CYP450 2B6	CYP2B6	Hs04183483_m1
	Époxyde hydrolase 1	EPHX1	Hs01116806_m1

7.2.2. Quantification de la production de cytokines pro-inflammatoires

La réponse inflammatoire a également été évaluée par la quantification protéique des cytokines. Pour cela, des tests ELISA (Enzyme Link Immunosorbent Assay) sandwich ont été effectués sur les surnageants de cellules exposées 6 à 24 heures. Le LPS à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été utilisé pour l'exposition des témoins positifs. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 β , IFN- γ et TNF- α ont été quantifiées en utilisant les kit ELISA MAX™ (BioLegend, Ozyme) selon les instructions du fabricant. Une plaque 96 puits a été utilisée pour fixer l'anticorps primaire spécifique, sur lequel sera ajouté 100 μL de surnageant de culture contenant les cytokines en duplicat. Le complexe formé a ensuite été incubé avec un anticorps secondaire spécifique, l'anticorps de détection. Entre chaque étape, les puits ont été lavés à l'aide d'un laveur de plaque et d'une solution de lavage afin de retirer l'excédent d'anticorps non-fixé. Enfin, le couplage de l'anticorps secondaire avec la peroxydase induit la formation d'un complexe coloré qui permet la quantification de la cytokine d'intérêt. La concentration a été lue à l'aide d'un lecteur de plaque (Varioskan™, ThermoFischer) à 450 et 570 nm pour les longueurs d'onde d'intérêt et de référence respectivement. L'intensité de la coloration est proportionnelle

Chapitre 2

Matériels et méthodes

à la concentration en cytokines dans l'échantillon. Les résultats sont exprimés en ratio par rapport au témoin.

7.2.3. Quantification de la réponse antioxydante par le glutathion

La réponse antioxydante des cellules a été étudiée avec le kit GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega). Ce kit permet de déterminer le ratio intracellulaire de glutathion sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG). Le glutathion sous forme réduite est une molécule antioxydante qui permet à la cellule d'éliminer les ERO. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent oxyder GSH à l'aide d'une enzyme, la glutathion peroxydase, et transforment deux GSH en un GSSG (Figure 20).

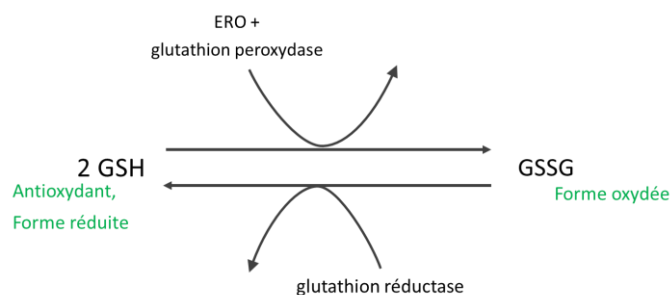


Figure 20 : Principe de l'oxydation et de la réduction du glutathion

Le kit de quantification du ratio GSH/GSSG permet de quantifier d'une part GSSG et d'autre part le glutathion total. Pour cela deux agents de lyse vont procéder à la réduction de GSSG en GSH, avec un blocage du GSH déjà présent pour la mesure de GSSG. Le GSH obtenu va convertir la luciférine-NT non-luminescente en luciférine luminescente par l'action de la glutathion-S-transférase. La luminescence est donc proportionnelle à la quantité de GSH présent dans les cellules lysées. Ainsi, des cellules exposées aux extraits de PM_{2.5} pendant 24 à 48 heures, ou au témoin positif H₂O₂ à 200 µM, sont lysées pendant 5 minutes par 50 µL de solution de lyse : total glutathione reagent ou oxidized glutathione reagent. 50 µL de l'agent de génération de luciférine sont ajoutés aux cellules lysées pendant 30 minutes à température ambiante, puis 100 µL de l'agent de détection de luciférine sont ajoutés. Le tout est transféré dans une plaque blanche opaque incubée 15 minutes et lue en luminescence grâce à un lecteur de plaque (Varioskan™, Thermo Fischer). La quantité de GSH est calculée selon la différence entre le glutathion total et GSSG, permettant le calcul du ratio GSH/GSSG. Les résultats sont exprimés en ratio par rapport au témoin.

7.2.4. Quantification de l'activité des cytochromes P450

La surexpression génique des CYP450 ne reflète pas de leur activité. Une méthode permet d'observer l'activation enzymatique des cytochromes au sein des cellules : le kit P450-Glo™ Assays (Promega), plus précisément le CYP1A Cell-Based Assay. Il a été utilisé pour étudier l'activité de la famille CYP1, comprenant la famille des CYP1A (CYP1A1, 1A2, etc.), mais aussi la famille des CYP1B (CYP1B1, etc.), ce test n'étant pas spécifique à l'une des deux familles. Le principe étant d'incorporer un substrat luminogénique, la pro-luciférine CEE et d'observer après 3 h d'incubation à 37°C la luminescence émise par les cellules qui auront métabolisé la pro-luciférine non-luminescente en luciférine luminescente. L'intensité de luminescence révélée par le lecteur de plaque (VarioSkan™, Thermo Fischer) est alors proportionnelle à l'activité métabolique de la famille des CYP1.

Le kit a été testé avec des cellules A549 et des hépatocytes (HepG2) qui possèdent une activité métabolique très importante. Trois composés ont été testés afin d'obtenir un témoin positif : l'oméprazole à 100 µM, le BaP à 100 µM, et l'extrait organique de l'échantillon certifié 1648a à 20 µg eq PM.cm⁻². Le BaP étant l'échantillon avec la réponse de luminescence la plus importante, il a été choisi comme témoin positif.

8. Validation des conditions d'exposition pour l'étude de la TEM

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme cellulaire que l'on retrouve dans certaines pathologies pulmonaires tels que l'asthme, la BPCO et l'évolution du cancer pulmonaire au stade métastatique. Dans un premier temps, il est important de vérifier que les cellules utilisées sont capables d'entrer dans le processus de TEM suite à une exposition aux PM_{2.5}. Pour cela il est indispensable d'effectuer à la fois l'étude morphologique et l'étude des biomarqueurs. Ainsi, uniquement les cellules A549 seront considérées pour cette étude. En effet, les cellules BEAS-2B expriment de manière constitutive certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, ce qui pourrait empêcher la bonne interprétation des marqueurs mésenchymateux (Han *et al.* 2020).

8.1. Étude morphologique

L'étude de la TEM n'a jamais été réalisé au sein de notre laboratoire. Ainsi, l'optimisation de certaines pratiques était nécessaire, notamment pour l'observation morphologique des cellules. Les cellules A549 ont été cultivées sur des lames de microscope (Nunc™ lab-Tek™ Chamber Slide™ System, ThermoFischer) à différentes concentrations d'ensemencement : 2 500, 5 000 et 10 000 cellules.cm⁻². Elles ont été exposées de 72 h à 7 jours à un facteur de croissance connu pour induire la TEM : le TGF-β à une concentration

Chapitre 2

Matériels et méthodes

de 10 ng.mL^{-1} . Pour une exposition de 72 h, la concentration d'ensemencement optimale était de $5\,000 \text{ cellules.cm}^{-2}$, et $10\,000 \text{ cellules.cm}^{-2}$ pour 7 jours d'exposition.

Les cellules sur lames ont ensuite été fixées et déshydratées à l'aide d'une solution d'Alcool Formolé Acétique (ou fixateur AFAA) pendant 10 minutes, suivi de deux incubations successives de 2 minutes à l'éthanol 70 % puis 95 % pour être conservées dans l'attente d'une coloration.

Après la réhydratation des cellules, celles-ci ont été colorées selon la méthode Hémalum Eosine (HE). L'hématoxyline de Harris colore les noyaux en violet et l'éosine Y colore le cytoplasme en rose. Après la coloration, les lames contenant les cellules ont été plongées dans deux bains successifs d'éthanol absolu pour les rendre hydrophobes et les monter sous lamelle grâce à la résine de montage Eukitt®. Les lames sont ensuite observées au microscope photonique (Zeiss Axioscope).

Les résultats présentés sur la Figure 21 reflètent l'état général des cellules sur la lame. La figure présente des cellules témoins non-exposées et des cellules exposées à 10 ng.mL^{-1} de TGF- β pendant 72 heures. Les cellules témoins sont très proches les unes des autres et forment un tapis cellulaire quasi-uniforme, similaire à un épithélium cuboïdal simple. Les cellules exposées au TGF- β pendant 72 h possèdent un phénotype différent des cellules témoins. On observe des cellules avec un cytoplasme plus étendu, en forme de lamellipode, et touchant les cellules avoisinantes à l'aide de filaments. Les cellules ne forment plus un tapis cellulaire uniforme, il est parsemé de cellules fuselées. On observe donc un changement morphologique en présence d'un inducteur de TEM sur les A549.

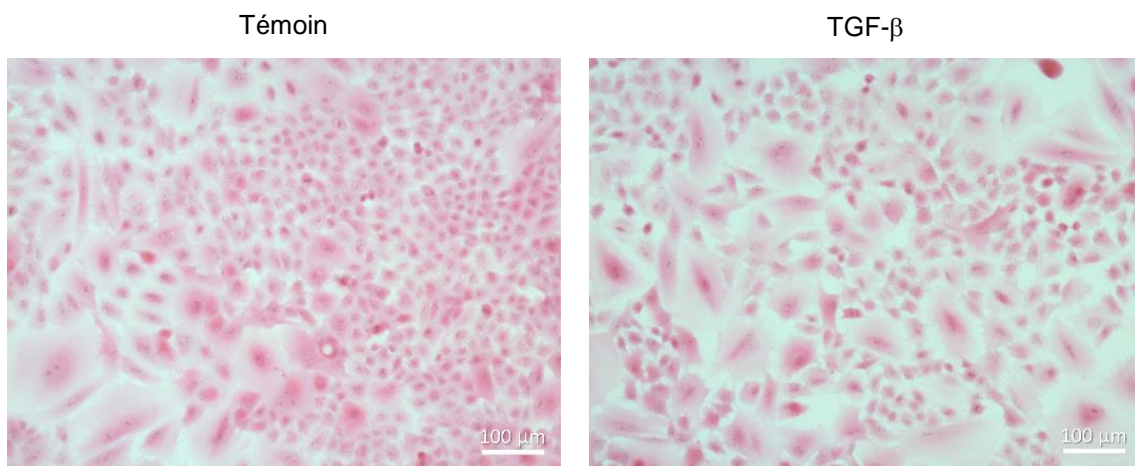


Figure 21 : Cellules A549 mises en culture à $5\,000 \text{ cellules.cm}^{-2}$, non-exposées et exposées à TGF- β pendant 72 h colorées en HE, observées au microscope photonique

8.2. Étude des biomarqueurs

Pour l'étude des biomarqueurs, il existe deux méthodes : l'étude des protéines en western blot et l'étude en microscopie par immunomarquage de ces mêmes protéines.

8.2.1. Étude des marqueurs de TEM par western blot

Dans un premier temps, la méthode du western blot va permettre de déterminer la présence ou l'absence de protéines suite à l'exposition aux composés d'intérêt. Les biomarqueurs utilisés sont des biomarqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

Des cellules ont été exposées aux extraits de PM_{2.5} pendant 3 à 7 jours dans des plaques 6 puits. Le TGF- β a été utilisé à 10 ng.mL⁻¹ comme témoin positif. Les protéines ont été extraites avec du M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent (ThermoFischer Scientific). Les extraits ont été mis à centrifuger 10 minutes à 2 500xg. Les protéines se trouvant dans le surnageant, celui-ci a été récupéré et congelé à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines extraites à l'aide du M-PERTM ont été dosées à l'aide de la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA), qui consiste en la réduction de Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines en milieu alcalin. Les ions Cu⁺ formés complexent avec le BCA, émettant une couleur pourpre ayant une longueur d'absorption optimale à 562 nm. La coloration pourpre est alors proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

Une fois les protéines quantifiées, 10 μ g de protéines préalablement dénaturées avec 5 μ L de tampon de Laemmli (Tris-HCl/SDS/Glycérol/ β mercaptoéthanol/Bleu de bromophenol) 4X et chauffées 5 minutes à 95°C, sont déposées dans les puits d'un gel pré-coulé en polyacrylamide de maille 4-20%. Les protéines vont migrer pendant 30-40 minutes à 50 V. Les protéines sont ensuite transférées en 3 minutes sur une membrane en nitrocellulose à l'aide du Trans-Blot[®] TurboTM (Bio-Rad). L'anticorps d'intérêt dilué au 1 000^{ème} est ajouté au gel avec un tampon de saturation (Tableau 17) et laissé à incuber à 4°C pendant 4 h minimum. Après avoir rincé l'excédent d'anticorps primaire, l'anticorps secondaire est dilué au 2 500^{ème} et est incubé 1h30 avec la membrane et un tampon de saturation. La membrane est installée sur le système d'imagerie ChemiDoc[®] (Bio-Rad) pour faire l'acquisition des protéines totales, puis sans bouger la membrane et en faisant la révélation avec le substrat Clarity MaxTM Western ECL, l'acquisition des protéines d'intérêt est réalisée. Ainsi les protéines d'intérêt sont normalisées par rapport à la quantité de protéines totales. Chaque échantillon est réalisé en duplicat.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Tableau 17 : Anticorps utilisés pour les western blot

Anticorps d'intérêt	Clone	Marqueur de TEM
E-cadhérine	24E10, Cell Signaling	Epithélial
N-cadhérine	D4R1H, Cell Signaling	Mésenchymateux
Vimentine	5G3F10, Cell Signaling	Mésenchymateux
ZO-1	D6L1E, Cell Signaling	Epithélial

9. Analyses statistiques et traitement de données

Les opérations de calculs élémentaires et des estimateurs statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 7.05 (GraphPad Software).

Pour les analyses descriptives, les données sont représentées par les moyennes et déviations standards.

Pour les analyses inférentielles, la normalité a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), puis l'égalité de variance a été vérifiée par le test de Levene ($p > 0,05$). Dans le cas où la normalité et l'égalité de variance sont vérifiées, le test ANOVA est effectué, suivi d'un test de Dunnett (post-hoc). Les résultats sont considérés significativement différents lorsque $p < 0,05$. Dans le cas où la normalité, ou l'égalité de variance ne sont pas obtenues, alors le test effectué était un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn (post-hoc). Les résultats sont considérés significativement différents lorsque $p < 0,05$.

Chapitre 3 :

Étude des caractéristiques des $PM_{2.5}$
prélevées sous les 4 influences

Chapitre 3 : Étude des caractéristiques des PM_{2.5} prélevées sous les 4 influences

1. Niveaux de concentration et composition des PM_{2.5} échantillonnés

1.1. Variations des concentrations de PM_{2.5} durant l'échantillonnage

Au cours des campagnes d'échantillonnage, la teneur en PM_{2.5} dans l'atmosphère a varié. La concentration moyenne en PM_{2.5} sur le site sous influence urbaine est de 10,8 µg.m⁻³, avec un minimum de 4,1 µg.m⁻³ et un maximum de 38,2 µg.m⁻³. Pour le site sous l'influence du trafic routier, la moyenne est de 10,9 µg.m⁻³, avec un minimum de 4,4 µg.m⁻³ et un maximum de 37,2 µg.m⁻³. Pour les sites de Calais sous l'influence des émissions portuaires et maritimes, la concentration moyenne en PM_{2.5} est de 8,8 µg.m⁻³, avec un minimum de 1,1 µg.m⁻³ et un maximum de 36,4 µg.m⁻³, tandis que pour Dunkerque, sous influence industrielle (station Atmo de Malo-les-Bains), la concentration moyenne était de 13,3 µg.m⁻³, avec un minimum de 1,8 µg.m⁻³ et un maximum de 36,2 µg.m⁻³. Ces concentrations moyennes apparaissent bien en deçà de la norme fixée par la directive 2008/50/CE en Union Européenne (25 µg.m⁻³ en moyenne annuelle), mais apparaissent dans le même temps, plus élevées que les recommandations de l'OMS (5 µg.m⁻³ en moyenne annuelle).

Il apparait que, lorsque l'on examine l'évolution des concentrations en PM_{2.5} sur les sites deux à deux sur la même période, celles-ci sont synchronisées (Figure 22 et Figure 23). Pour les sites de Lille Fives et Roubaix, les concentrations sont très proches. Ceci tend à montrer que les niveaux de concentration en PM_{2.5} sur les deux sites ne sont pas gouvernés par une source locale mais correspondent principalement à la fluctuation d'un fond atmosphérique.

Toutefois, pour les sites de Calais et Dunkerque, la tendance globale est la même avec des concentrations supérieures pour le site de Dunkerque. Certains jours se distinguent aussi par des écarts de concentrations plus importants entre les sites (Figure 23). Ces variations peuvent s'expliquer par les émissions locales des villes de Calais et Dunkerque. Il est important de noter que sur le site sous influence industrielle, les données de PM_{2.5} sont les données provenant de la station Atmo de Malo-les-Bains, qui se situe à 7 km du lieu de prélèvement de particules ainsi, les concentrations de particules sur le lieu de prélèvement peuvent être différentes. Les différences locales pourront être expliquées de manière plus détaillée en étudiant la composition des PM_{2.5}.

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

Notons que durant nos campagnes, le réseau de mesures de la qualité de l'air Atmo Hauts-de-France a répertorié des épisodes de pollution (traduit par des * sur les Figure 22 et Figure 23) dûs à la persistance de PM₁₀ sur les différents territoires. Ceux-ci ont été enregistrés, le 05/11/20, c'est-à-dire pendant les premiers échantillonnages sur la métropole européenne de Lille, et du 26/11/20 au 28/11/20, pendant la seconde période d'échantillonnage. Ce dernier s'est étalé sur trois jours sur la région du Nord Pas-de-Calais.

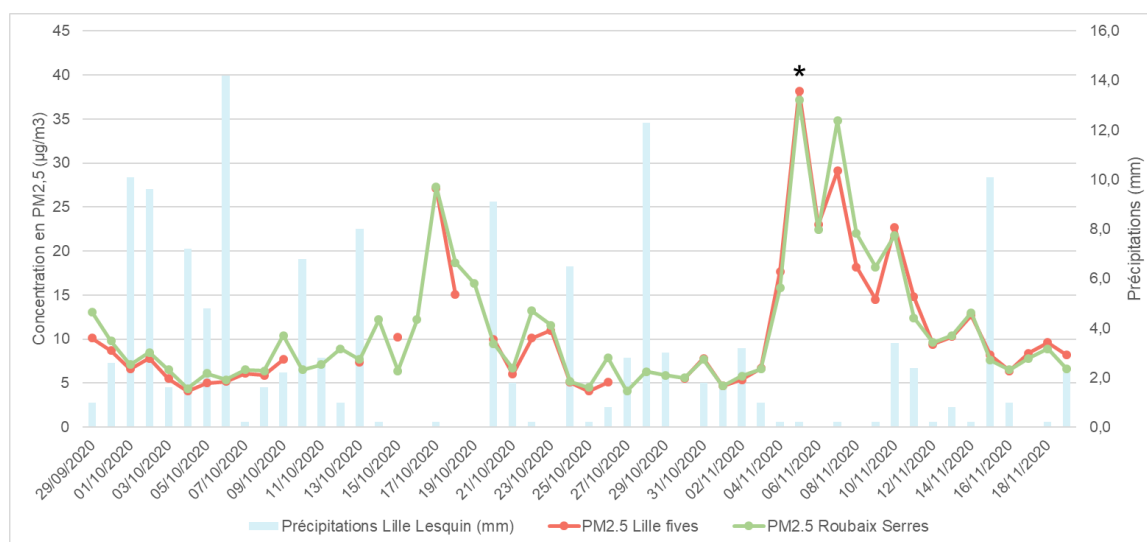


Figure 22 : Évolution de la concentration en PM_{2.5} sur la période d'échantillonnage à Lille et Roubaix, et précipitations à Lille Lesquin (* : épisode de pollution (Atmo))

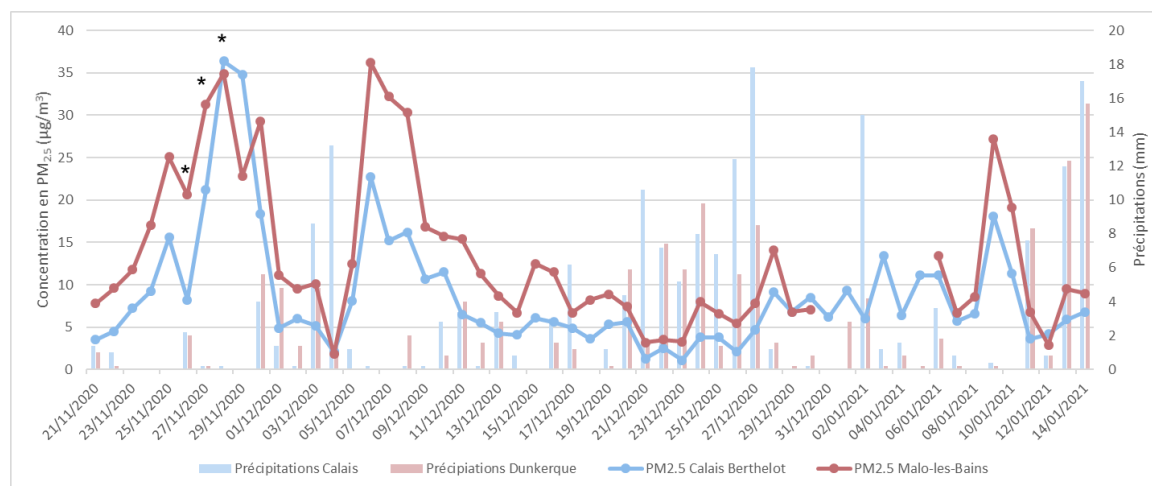


Figure 23 : Évolution de la concentration en PM_{2.5} sur la période d'échantillonnage à Calais et Dunkerque, sur les stations Atmo les plus proches, avec les précipitations de Calais et Dunkerque (* : épisode de pollution (Atmo))

Les données de précipitations sur chaque site ont été étudiées. Pour les sites sous influence urbaine et trafic routier, 140 mm de précipitation sont tombés au cours de la période

de prélèvement, 132 mm sur le site sous influence industrielle et 189 mm sur le site sous influence du trafic maritime. Ces valeurs de précipitations sont nettement supérieures aux normales de saisons calculées pour la même période entre 1991 et 2020. En moyenne sur les sites sous influence urbaine et trafic routier, il y a eu 30 mm de précipitations en plus, sur le site sous influence industrielle c'est 20 mm en plus, et pour le site sous influence maritime, il y a eu 40 mm de précipitations en plus lors des périodes d'échantillonnage. Cet excédent de précipitations peut expliquer les faibles concentrations moyenne en PM_{2.5} sur la période.

Lorsque les valeurs de concentration de PM_{2.5} journalières sont comparées aux valeurs de précipitations (Figure 22 et Figure 23), un lien entre les deux est visible. En effet, lors de fortes précipitations, les concentrations en PM_{2.5} ont tendance à être faibles. Ceci s'explique par un abattement des particules au sol avec la pluie. Ce phénomène est connu sous le nom de « rain out » et de « wash out ». Le « rain out » correspond à l'incorporation des composés chimiques et des particules dans les gouttelettes lors de la formation des nuages. Le « wash out » lui équivaut à l'incorporation des particules lorsque la pluie tombe au sol, similaire à un lessivage de l'atmosphère.

1.2. Étude de l'origine géographique des PM_{2.5}

Les roses de concentration de PM_{2.5} (Figure 24) permettent de mettre en évidence les directions de vent responsables des niveaux les plus élevés de PM_{2.5}. Nous observons des profils similaires sur les sites sous les influences du trafic routier et urbaine, avec des niveaux de PM_{2.5} plus élevés pour des vents de secteur Nord, Nord-Est à Est et Sud-Est. Ces observations sont fréquentes dans la région HdF, avec notamment une situation anticyclonique et des conditions sèches accompagnant les vents du secteur Nord-Est, favorables à l'accumulation des polluants. À l'opposé, les vents du secteur Sud-Ouest sont généralement associés à des situations dépressionnaires, avec de la pluie et des vents fort favorables à la dispersion des polluants. Les prélèvements ayant eu lieu en même temps et sur des sites relativement proches (10 km), la similarité de l'évolution des niveaux de PM_{2.5} confirme que l'origine des particules n'est pas liée à l'influence ponctuelle d'une seule source bien localisée, mais bien due à une influence à une échelle plus large.

Pour les sites sous influences maritime et industrielle, les niveaux de concentrations de PM_{2.5} les plus élevés sont associés à des vents du Sud-Est et de l'Est. Les profils de roses de concentration de PM_{2.5} sont différents et suggèrent l'influence de sources locales. De plus, ces différentes orientations de vents peuvent être associées à des sources locales. Les sources présumées pour l'influence maritime se trouvent principalement au Nord, Nord-Ouest pour le port de Calais et la route maritime en direction de l'Angleterre, mais aussi par extension à l'Ouest pour le trafic provenant de la Manche et allant vers la Mer du Nord. Pour l'influence

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

industrielle, les sites industriels sont situés dans le quart Nord-Ouest par rapport au site d'échantillonnage. Nous observons que les concentrations les plus élevées ne se situent pas dans la direction des sources présumées et ciblées. Nous pouvons remarquer ici que, sur les deux sites, ces roses pointent vers les zones les plus densément peuplées, et nous pouvons suggérer ici que les activités domestiques et le trafic automobile associé, en plus de conditions atmosphériques favorables (vents de secteur Est, et temps sec), expliquent les niveaux maximums de PM_{2.5} observés dans ces directions de vent. Par la suite, il conviendra de considérer plus spécifiquement des échantillons prélevés sous le vent des sources cibles pour mieux en déterminer les caractéristiques.

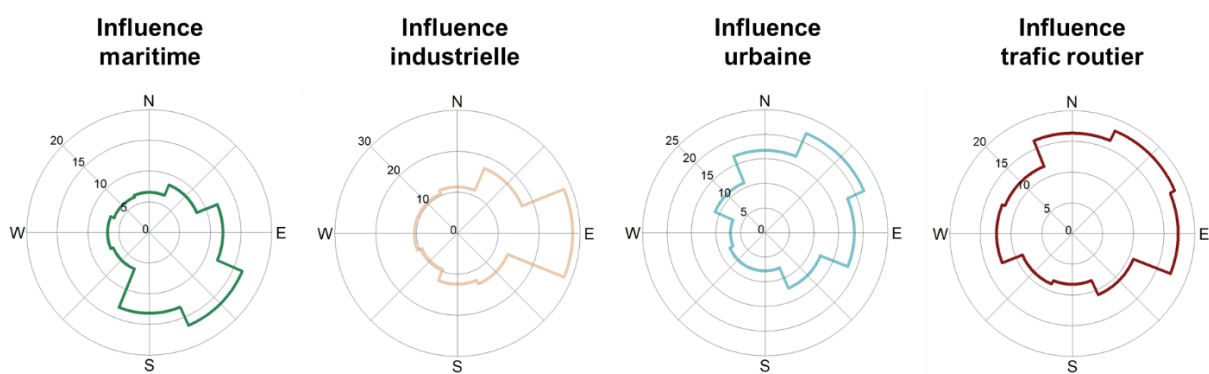


Figure 24 : Roses de concentration de PM_{2.5} sur les sites sous influences maritime (du 21/11/20 au 14/01/21), industrielle (du 21/11/20 au 05/01/21), urbaine (du 29/09/20 au 19/11/20) et trafic routier (du 29/09/20 au 19/11/20) ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$).

1.3. Composition chimique des PM_{2.5} collectées

Pour l'étude des composés organiques, un échantillon moyen par site a été constitué à partir de l'ensemble des filtres collectés, avant d'être extrait puis analysé (Chapitre 2, partie 4.4). Deux échantillons supplémentaires ont été considérés en ciblant plus spécifiquement les secteurs de vent reliés à l'influence industrielle et à celle portuaire et maritime. La sélection a été effectuée à partir de la direction de vent associée aux prélèvements et des premiers résultats de caractérisation chimique.

1.3.1. Espèces inorganiques et carbone total

L'étude des espèces inorganiques et du carbone total a été effectuée sur chacun des échantillons selon les méthodes décrites dans le Chapitre 2, parties 4.1 et 4.2. Nous disposons ainsi de la composition journalière des PM_{2.5} prélevées sur chacun des sites. Ceci nous permettra par la suite d'utiliser un modèle récepteur pour l'identification plus précise des

sources et l'estimation de leur contribution à la teneur en PM_{2,5} sur la période et sur chacun des sites.

Les concentrations moyennes en éléments inorganiques et en carbone total associées aux PM_{2,5}, calculées sur la période de prélèvement pour chacun des sites sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Concentration en éléments inorganique et carbone total pour chaque influence, en moyenne pour la période de prélèvement (ng.m⁻³).

Influences Eléments	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier	Spécifique Maritime	Spécifique Industrielle
Ag	2,3	4,2	2,8	7,2	1,06	11,9
Al	12,2	38,7	30,1	49,0	11,4	49,9
As	0,42	0,60	0,27	0,97	0,30	0,72
Ba	0,66	0,98	0,65	2,3	0,5	0,83
Bi	0,09	0,11	0,05	0,18	0,04	0,13
Cd	0,15	0,21	0,13	0,49	0,07	0,38
Ce	0,02	0,05	0,05	0,33	0,03	0,06
Co	0,06	0,06	0,02	0,09	0,09	0,11
Cr	0,49	1,1	0,45	2,2	0,30	1,4
Cu	1,5	2,1	4,7	15,4	0,83	2,7
Fe	38,1	299	50	102	19,5	1097
La	0,04	0,03	0,02	0,07	0,04	0,04
Mn	2,5	13,8	1,3	2,3	0,76	28,8
Mo	2,5	2,2	9,6	12,0	2,9	3,2
Ni	0,46	5,8	0,08	0,20	0,87	2,1
Pb	4,0	6,0	4,0	14,2	2,6	13,8
Rb	0,32	0,97	0,24	0,78	0,13	3,2
Sb	0,48	0,39	1,2	4,0	0,48	0,40
Sn	0,82	1,8	0,92	3,6	0,28	0,86
Sr	0,31	0,29	0,25	0,32	0,35	0,46
Ti	0,94	1,1	0,92	1,5	0,66	1,9
Tl	0,04	0,17	0,02	0,10	0,01	0,49
V	0,57	0,56	0,39	1,1	0,53	0,60
Zn	10,0	21,5	13,7	21,9	5,3	39,1
∑ éléments métalliques	79	402	121	242	49	1260
Ca ²⁺	25,7	48,6	63	138	22,0	105
Cl ⁻	300	192	76	99	238	445
K ⁺	96	141	82	81	50	233
Mg ²⁺	26,6	20,0	14,0	18,2	33,6	40,4
Na ⁺	238	167	109	112	302	310
NH ₄ ⁺	798	789	349	414	259	291
NO ₃ ⁻	1782	1869	810	996	692	607
SO ₄ ²⁻	922	941	535	530	474	904
C_{total}	1367	2347	3467	5321	769	1591

Les résultats de l'étude des composés majeurs (Figure 25) montrent que les concentrations en carbone total les plus élevées se trouvent sur le site sous influence du trafic routier. Les émissions des voitures produisent des quantités importantes de carbone organique et élémentaire.

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

Parmi les ions mesurés, NO₃⁻, SO₄²⁻ et NH₄⁺ montrent les teneurs les plus élevées. Ces ions sont connus pour être abondants dans notre région (Kfoury *et al.* 2016 ; Ledoux *et al.* 2006), résultant de la conversion gaz particules. Ils forment les aérosols inorganiques secondaires, NH₄NO₃ et (NH₄)₂SO₄.

Les sites de Calais et Dunkerque, respectivement sous les influences maritime et industrielle, montrent tous deux des concentrations élevées en Na⁺, Cl⁻ et Mg²⁺ qui sont des composés qui constituent l'eau de mer, et que l'on retrouve donc en grandes quantités aux abords des côtes, et typiques de prélèvements influencés par des vents marins.

Si l'on considère la somme des concentrations en éléments métalliques du site sous influence industrielle, celle-ci apparaît 2 fois supérieure à celle du trafic routier, 3 fois supérieure au site urbain, et 4 fois supérieure au site sous influence maritime (Figure 25). Le fer est l'élément qui contribue à 40 % de la masse des métaux étudiés pour les échantillons maritime, urbain et trafic routier, et jusqu'à 74 % de la masse des métaux pour le site sous influence industrielle (Figure 26), en cohérence avec l'activité sidérurgique importante sur ce site.

Les deux autres éléments qui contribuent en plus grande partie à la fraction métallique sont le zinc et l'aluminium. Ils contribuent entre 14 et 35 % à la masse de métaux des échantillons (Figure 26). Ces éléments peuvent avoir des origines diverses, mais sont principalement associés aux activités métallurgiques, aux émissions non canalisées du trafic routier, ou aux aluminosilicates pour Al.

Le site influencé par le trafic routier se démarque par certaines teneurs plus élevées en éléments comme le Ba, le Cu et le Zn. Ces derniers sont connus pour être des traceurs des émissions de véhicules. En effet, le Ba est retrouvé dans les huiles de moteurs (Monaci et Bargagli 1997), Zn est un élément caractéristique qui peut être associé aux particules résultant de l'usure des pneus (Gietl *et al.* 2010), et le Cu a été identifié comme relié à l'usure des disques et plaquettes de freins (Gietl *et al.* 2010). Les retrouver en plus grande quantité pour ce site confirme que le site choisi est bien le plus sous influence du trafic routier.

Le site sous influence industrielle se distingue par sa forte teneur en métaux, en particulier Fe, K, Mn, Cu, Zn et Al, comme observé dans des études précédentes (Hleis *et al.* 2013 ; Kfoury *et al.* 2016). Le site de Dunkerque se caractérise par la présence d'une aciérie intégrée. Le fer est l'élément principal contenu dans le minerai pour la fabrication de l'acier ; les oxydes de Fe sont également émis au niveau des hauts-fourneaux. Mg et Al peuvent être présents dans les matériaux fondants. Le K, ainsi que certains métaux traces comme Cd, Cr, Cu et Zn, peuvent provenir des émissions en sortie de cheminées de l'usine

d'agglomération. Zn peut également avoir pour origine l'utilisation de ferrailles galvanisée, utilisées pour affiner les différentes formations d'aciers dans les convertisseurs de l'aciérie.

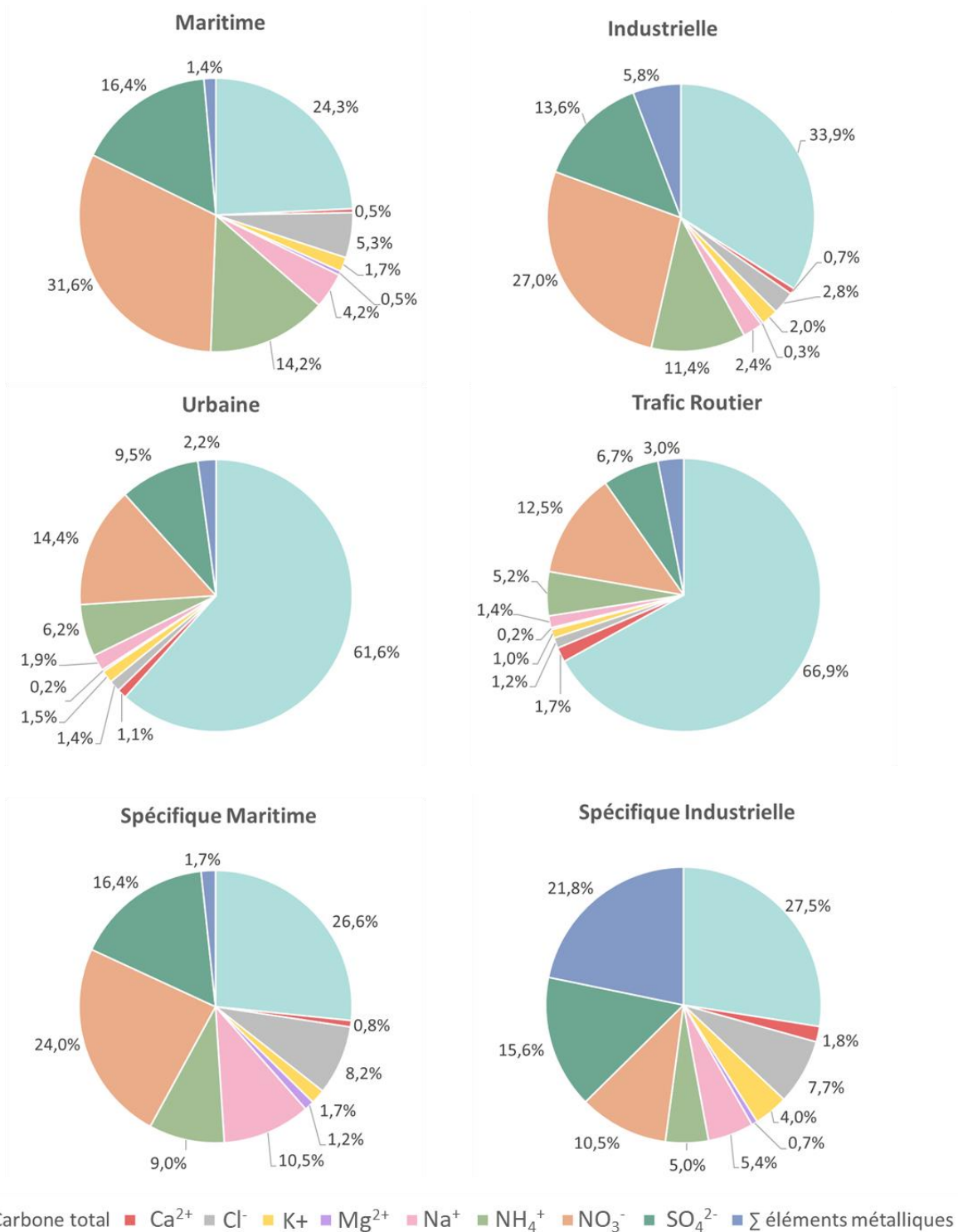


Figure 25 : Composition moyenne (%) des PM_{2.5} selon les différentes influences.

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

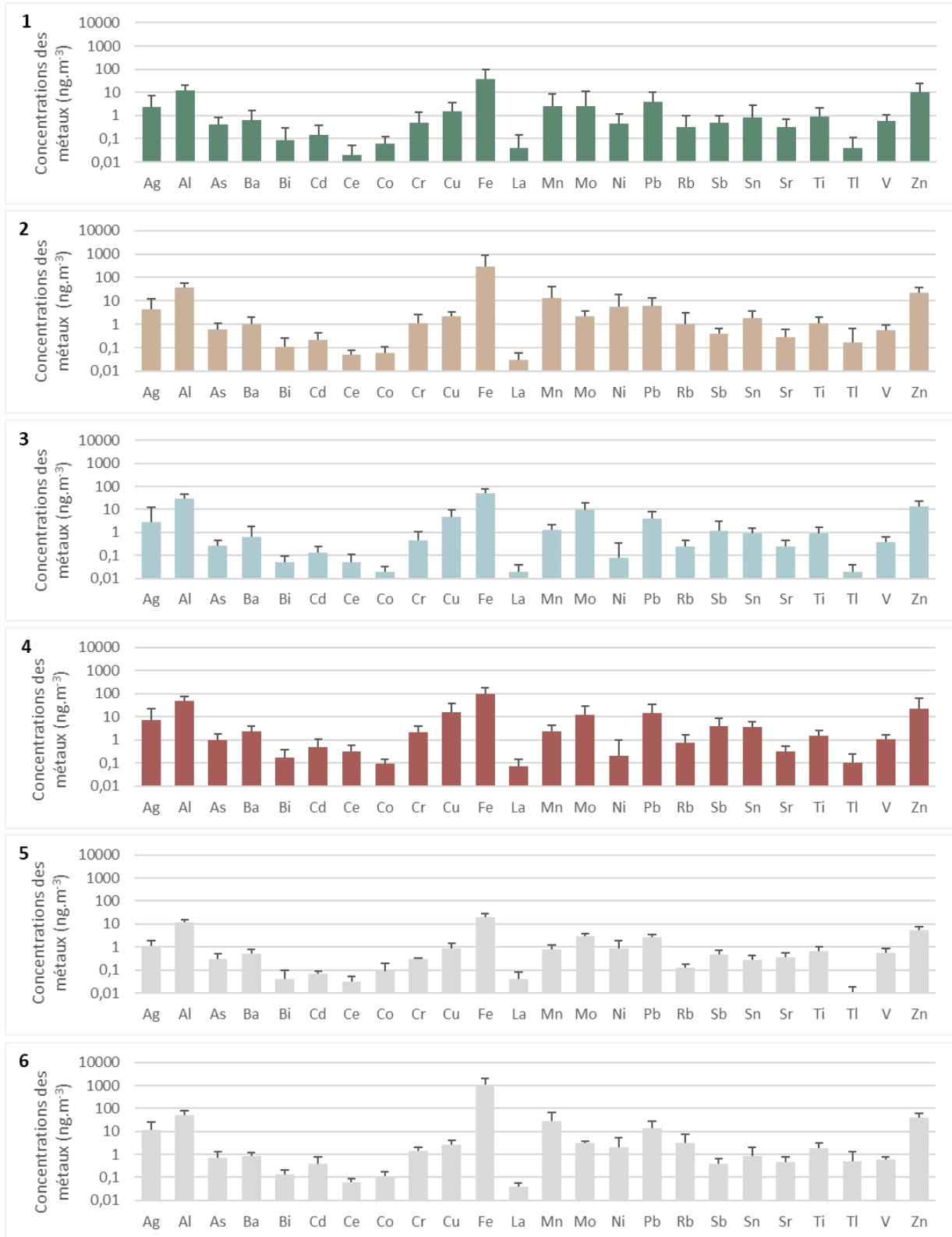


Figure 26 : Répartition des éléments métalliques selon les sites sous influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifique industrielle (6) en concentration moyenne (ng.m⁻³).

1.3.2. Composés organiques

L'étude des composés organiques va porter sur la caractérisation des alcanes, des HAP et leurs dérivés, des phtalates et du bisphénol A, selon les différentes influences.

1.3.2.1. *Alcanes*

L'étude de la distribution des alcanes permet de renseigner sur les sources dominantes. De manière générale, les alcanes à nombre de carbone impair sont plutôt associés à des sources naturelles tandis que ceux à nombre pair sont plus associés à des sources anthropiques (Fadel *et al.* 2021 ; Melki *et al.* 2017).

Les concentrations moyennes par site oscillent entre 30 et 57 ng.m⁻³ pour tous les alcanes confondus, selon les influences de PM_{2.5}. En effet, la somme des alcanes est plus faible pour l'influence spécifique industrielle (30,6 ng.m⁻³), suivi de l'influence spécifique maritime (38,9 ng.m⁻³). La quantité d'alcane est plus élevée pour les sites sous influence urbaine (40,9 ng.m⁻³), maritime (43,1 ng.m⁻³) et industrielle (45,0 ng.m⁻³). Le site trafic routier possède la plus grande concentration d'alcane avec 57,7 ng.m⁻³. Ces concentrations sont plus élevées que celles retrouvées sur le site urbain-industriel de Dunkerque lors de précédents prélèvements (23 ng.m⁻³) (Landkocz *et al.* 2017).

La distribution des alcanes pour les différentes influences est présentée sur la Figure 27. Les alcanes les plus abondants sont répartis entre C22 et C33 pour l'ensemble des échantillons. De plus, pour les 4 sites sous influences non-spécifiques, nous pouvons observer que les alcanes impairs dominent, c'est-à-dire ceux correspondant plutôt à des sources naturelles. À l'inverse, les deux influences dites spécifiques ont des concentrations plus élevées en alcanes impairs, associés à des sources anthropiques.

Plusieurs indices peuvent être utilisés pour qualifier et expliquer la distribution des alcanes, notamment le « Carbon Preference Index » (CPI) et l'indice « Wax% », indice permettant de calculer le pourcentage d'alcane liés à la végétation (cires végétales).

Plus précisément, il est possible de calculer un indice CPI en considérant tous les alcanes ou plutôt les alcanes à longue chaîne, overall CPI et High CPI, respectivement :

$$\text{Overall CPI}_{15-35} = (\sum \text{impairs } C_{15-33} + \sum \text{impairs } C_{17-35}) / 2 \times (\sum \text{pairs } C_{14-36})$$

$$\text{High CPI}_{25-35} = (\sum \text{impairs } C_{25-33} + \sum \text{impairs } C_{27-35}) / 2 \times (\sum \text{pairs } C_{26-34})$$

Ces indices CPI sont couramment explorés sous la forme d'un graphique permettant de déterminer l'origine principale des alcanes (Figure 28), anthropiques et/ou naturels. Les valeurs de CPI obtenues montrent que les influences spécifiques industrielle et maritime se

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

situent en dessous de 1,5 pour High CPI, ce qui indique la contribution de sources anthropiques. De plus, les valeurs de Overall CPI de ces deux influences sont inférieures à 1, synonyme de la contribution de sources pétrogéniques. L'influence maritime possède également un High CPI inférieur à 1,5 mais une valeur supérieure à 1 pour le Overall CPI. Cette influence est donc à caractère anthropique. Les influences urbaine, industrielle et trafic routier ont un High CPI compris entre 1,5 et 3, ce qui les qualifie d'origine anthropique et naturelle. Toutefois, les échantillons sont majoritairement proches de 1,5 en High CPI, ce qui indique que les sources de contribution des PM_{2.5} sont majoritairement anthropiques.

L'indice Wax% permet d'évaluer la contribution des sources biogéniques, notamment par la présence de cires végétales dans les échantillons (Tableau 19). Les influences urbaine et trafic routier donnent les plus grandes valeurs d'indice Wax, 19 et 16 % respectivement. Les sites sous influences industrielle et maritime possèdent des indices Wax inférieurs (14 et 8 % respectivement), ce qui pourrait être dû à leur proximité à la mer : les vents marins sont porteurs de peu de cires végétales. Les échantillons sous influences spécifiques maritime et industrielle sont caractérisés par de plus faibles valeurs encore (1 %). Ces influences spécifiques englobent des directions de vent qui pointent globalement vers les secteurs marins.

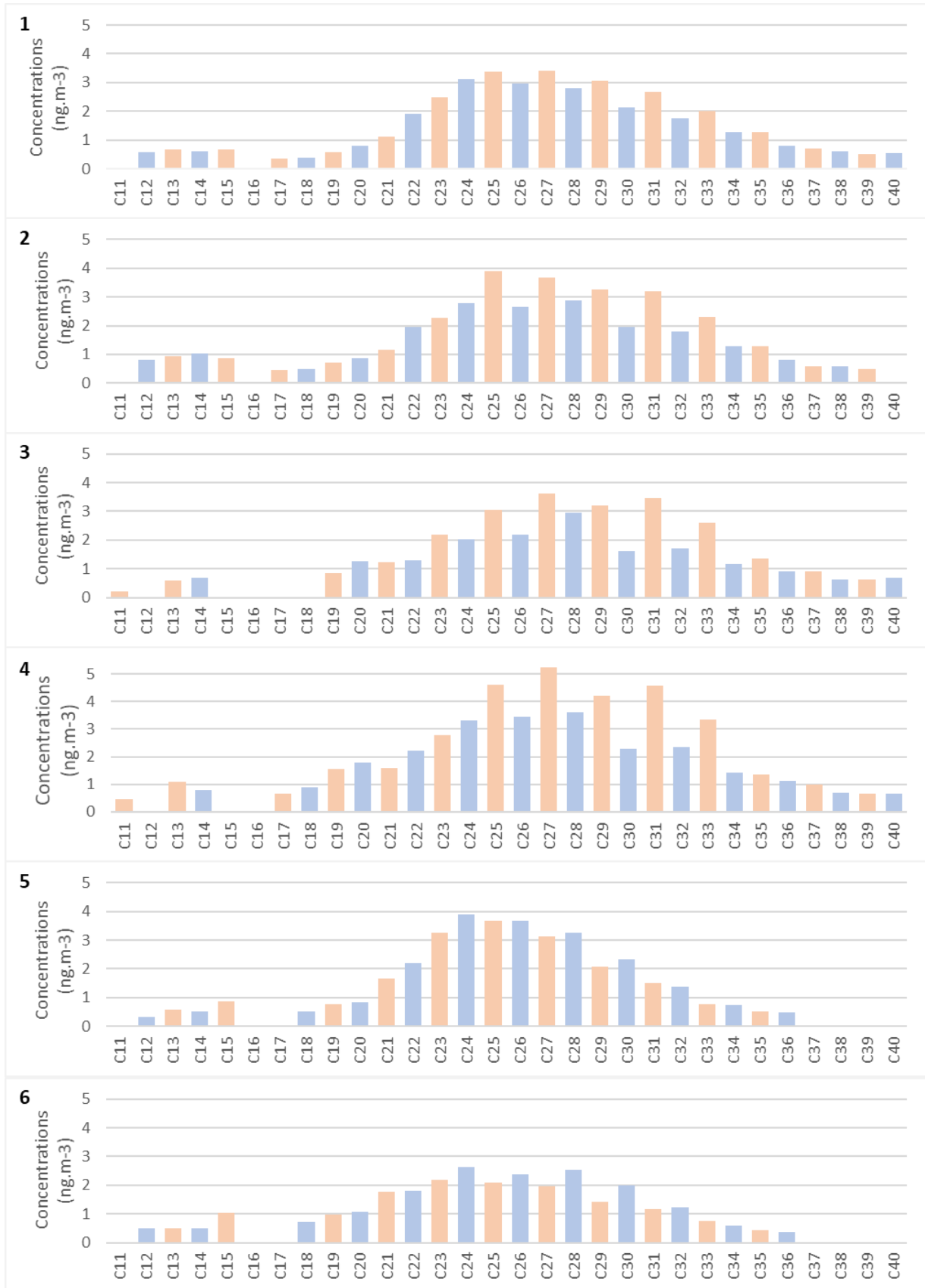


Figure 27 : Répartition des alcanes présents dans les PM_{2.5} selon les influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifique industrielle (6) en concentration moyenne (ng.m⁻³), avec les alcanes pairs en bleu et impairs en orange.

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

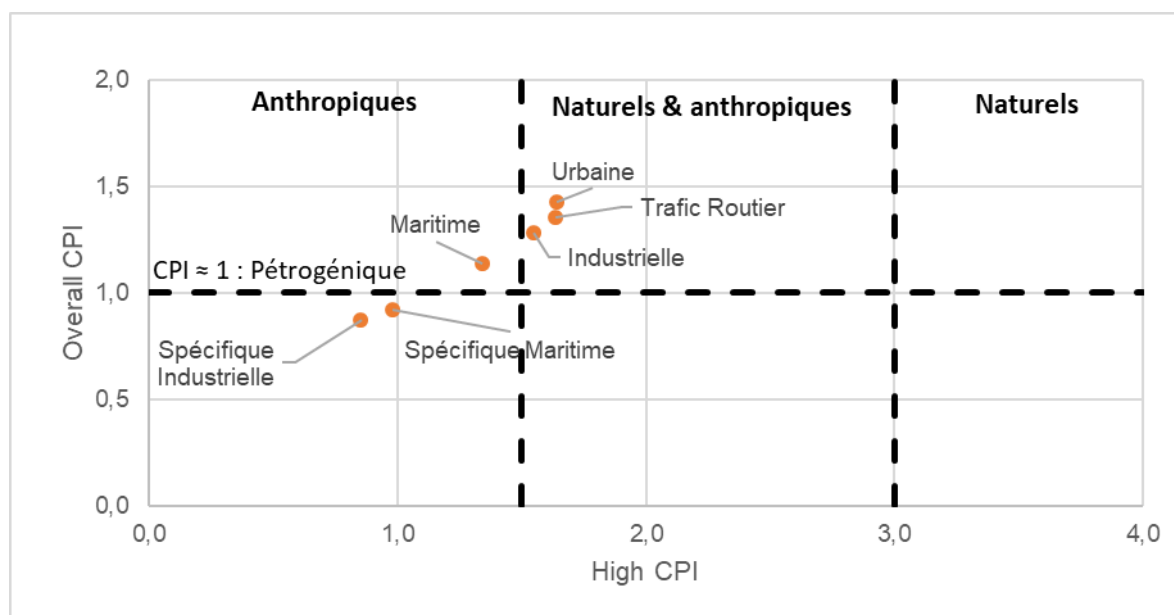


Figure 28 : Identification des sources des alcanes par utilisation du Carbone preference index (CPI) suivant l'origine des PM_{2.5}

Tableau 19 : Estimation de la contribution des cires (Wax) provenant des végétaux dans les PM_{2.5} collectées sous différentes influences

Influences	Cires (%)
Maritime	8
Industrielle	14
Urbaine	19
Trafic Routier	16
Spécifique Maritime	1
Spécifique Industrielle	1

1.3.2.2. HAP, oxy-HAP et nitro-HAP

Les HAP étudiés sont les 16 HAP jugés prioritaires par l'US-EPA. Les profils de HAP apparaissent quasiment similaires sur les quatre sites. Les concentrations totales de HAP (Tableau 20) sont plus importantes sur les sites sous influences industrielle et spécifique industrielle (4,4 et 7,6 ng.m⁻³). Ces concentrations sont 2,5 à 4,5 fois supérieures à celles des autres influences. Ceci peut être lié à l'industrie et aux émissions de la cokerie, comme démontré dans une étude publiée par Riffault *et al.* (2015) à proximité de ce site. Les influences maritime, urbaine, trafic routier et spécifique maritime aboutissent à des concentrations de HAP comprises entre 1,5 et 1,9 ng.m⁻³. Des concentrations similaires à celles de l'échantillon sous influence spécifique industrielle ont été observées sur le site urbano-industriel de Dunkerque lors d'une précédente étude (Landkocz *et al.* 2017), avec une concentration moyenne totale en HAP de 7,7 ng.m⁻³. Les valeurs obtenues pour les autres influences sont similaires à des valeurs obtenues au Liban, sur un site urbain (1,16 ng.m⁻³) (Borgie *et al.* 2015),

sur un site résidentiel à proximité d'une centrale thermique, et sur un site moins peuplé avec des cimenteries (2,56 et 0,95 ng.m⁻³) (Fadel *et al.* 2021).

Les profils de HAP (Figure 29) apparaissent similaires pour les influences maritime, industrielle, trafic routier, urbaine et spécifique industrielle. Les HAP majoritaires pour ces influences sont le benzo[b]fluoranthène (B[b]F), loin devant l'indeno[1,2,3-c,d]pyrène (InPy), le benzo[g,h,i]perylène (B[g,h,i]Pe), le benzo[e]pyrène (BeP), le benzo[a]pyrène (BaP), le chrysène (Chr) et le benzo[a]anthracène (B[a]A). Le B[b]F est émis globalement lors de combustions incomplètes d'hydrocarbures ou de charbon. Il est uniquement d'origine anthropique et peut avoir différentes sources dont le trafic automobile ou la cokéfaction du charbon (INERIS 2020). Le profil relatif à l'influence spécifique maritime est différent des autres avec des teneurs 4 fois plus élevées en InPy et B[g,h,i]Pe, comparé aux concentrations des autres HAP. Ces deux espèces, tout comme le B[b]F, sont émises lors de combustions incomplètes, notamment véhiculaires et domestiques (Fadel *et al.* 2021 ; INERIS 2021, 2022).

À partir des concentrations en HAP, il est possible de calculer des ratios caractéristiques afin de mettre en évidence des sources ou des origines particulières. Le ratio de concentration en HAP liés à la combustion (C_{HAP}) par rapport aux HAP totaux (T_{HAP}) montre des valeurs aux alentours de 0,85 pour l'ensemble des sites, à l'exception du site sous influence spécifique maritime (Tableau 20). La littérature montre des valeurs de référence à 0,7 pour un milieu urbain et 0,96 pour une zone fortement industrialisée (Gogou *et al.* 1996 ; Yue et Fraser 2004). Dans notre cas, les influences industrielle et spécifique industrielle induisent un ratio de 0,83 et 0,79. Ceci tend à démontrer que le site de prélèvement n'était pas soumis intensément aux émissions industrielles. Toutefois, les valeurs sont supérieures aux valeurs de référence pour le milieu urbain. De plus, les prélèvements de particules ont eu lieu avec des conditions météorologiques particulières avec notamment de fortes pluies et un niveau de PM_{2.5} globalement bas. L'influence spécifique maritime possède un ratio de 0,95, ce qui est plutôt élevé, et qui pourrait être lié à la présence des nombreuses émissions de combustion véhiculaire (phases de démarrage et d'arrêt des camions et véhicules lors de leur entrée dans les ferrys).

D'autre part, le ratio $InPy/(InPy+B[g,h,i]Pe)$ peut renseigner sur les émissions liées au trafic routier, en faisant notamment la différence entre les combustions essence et diesel. Les valeurs entre 0,2 et 0,5 correspondent à la combustion de l'essence, et entre 0,3 et 0,7 plutôt à la combustion de diesel (Fadel *et al.* 2021). Globalement, les ratios obtenus sous nos 6 influences sont compris entre 0,41 et 0,54. Ces résultats sont compris dans les valeurs de

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

référence à la fois pour la combustion d'essence et de diesel. Les émissions sont donc mixtes et issues des deux types de carburant. Le site sous influence trafic routier possède le ratio le plus bas à 0,41, ce qui pourrait venir d'une proportion moindre de véhicules diesel.

Le ratio Fla/(Fla+Pyr) permet d'avoir une information sur la contribution d'autres sources de combustion. Les valeurs typiques que l'on peut retrouver sont de 0,4 à 0,5 pour la combustion de combustibles fossiles à l'état liquide, et supérieures à 0,5 pour la combustion de bois et de charbon (Fadel *et al.* 2021). Les 6 influences montrent des valeurs de ratio comprises entre 0,45 et 0,59. Les influences trafic routier et spécifique maritime possèdent des ratios de 0,49 et 0,45 respectivement, et seraient compatibles avec des émissions issues de combustibles fossiles à l'état liquide. Ces émissions pourraient donc provenir des émissions véhiculaires, ce qui est en accord avec les observations précédentes. Le site sous influence maritime est un site portuaire roll-on/roll-off : avec près de 10 millions de voyageurs par an et un nombre de véhicules transitant par bateaux, cette forte contribution de la source véhiculaire peut s'expliquer. Pour les sites sous influence industrielle et spécifique industrielle, les valeurs de ratio Fla/(Fla+Pyr) sont les plus élevées obtenues, avec 0,58 et 0,79 respectivement. Ces ratios sont compatibles avec les émissions associées à la cokéfaction du charbon sur le site de sidérurgie intégrée.

Les équivalents toxiques (TEQ) en BaP ont été calculés en utilisant les valeurs de TEQ de référence publiées par Nisbet & LaGoy (1992), qui sont également utilisés pour l'évaluation de toxicité des HAP contenus dans les PM par voies aériennes (Petry *et al.* 1996). Les valeurs obtenues pour les influences spécifiques maritime, trafic routier, maritime et urbaine sont les plus faibles (0,24, 0,33, 0,43, et 0,48 ng eq BaP.m⁻³ respectivement). Les valeurs les plus élevées ont été obtenues pour les sites sous influences industrielle (1,29 ng eq BaP.m⁻³) et spécifique industrielle (2,16 ng eq BaP.m⁻³). Les émissions industrielles sont les plus problématiques en termes de toxicité équivalent en BaP.

Signalons que deux autres HAP connus pour leurs valeurs élevées de TEQ ont également été quantifiés. Le dibenzo[a,e]pyrène (DB[a,e]P) se trouve dans des concentrations comprises entre 0,01 et 0,10 ng.m⁻³, les plus grandes concentrations étant à nouveau pour les deux influences industrielles. Le dibenzo[a,i]pyrène (DB[a,i]P) a pu être quantifié pour deux influences, industrielle et urbaine, à des concentrations de 0,006 et 0,001 ng.m⁻³ respectivement. Ces deux molécules ont un TEQ égal à 10 (ATSDR 2022). À notre connaissance, ces deux HAP ont été très peu étudiés dans les PM_{2.5}, et seulement deux études ont quantifié ces HAP. Une étude à Turin, (Italie) a montré des concentrations en DB[a,e]P à 0,07 ng.m⁻³, et de 0,09 ng.m⁻³ pour DB[a,i]P (Gilli *et al.* 2007) et une autre à Taiwan observe des concentrations de 0,04 ng.m⁻³ de DB[a,e]P et 0,02 ng.m⁻³ de DB[a,i]P.

Le benzo[e]pyrène a également été quantifié. Il est présent dans les différents échantillons, exceptés ceux sous influence industrielle, à des concentrations allant de 0,10 à 0,22 ng.m⁻³. Pour les échantillons sous influence industrielle et spécifique industrielle, les concentrations sont de 0,51 et 0,85 ng.m⁻³. Ce HAP ne possède pas de TEQ car il possède une faible activité biologique, due notamment à sa métabolisation ne formant pas le 7,8-diol-9,10-epoxide comme le BaP (IARC 1983).

Tableau 20 : Somme des concentrations de HAP de combustion (C_{HAP}) et totaux (T_{HAP}), ratios des HAP issus des différentes influences et équivalent toxique en BaP (BaP TEQ). (C_{HAP} : Flu + Pyr + Chr + B[a]A + B[b]F + B[k]F + B[a]P + InPy + B[g,h,i]Pe)

	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier	Spécifique maritime	Spécifique Industrielle
C_{HAP} (ng.m⁻³)	1,71	4,44	1,65	1,53	1,94	7,64
T_{HAP} (ng.m⁻³)	1,97	5,35	1,92	1,84	2,04	9,65
C_{HAP}/T_{HAP}	0,87	0,83	0,86	0,83	0,95	0,79
Fla/(Fla+Pyr)	0,54	0,58	0,53	0,49	0,45	0,59
InPy/(InPy+B(g,h,i)Pe)	0,52	0,53	0,53	0,41	0,54	0,53
BaP TEQ	0,43	1,29	0,48	0,33	0,24	2,16

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

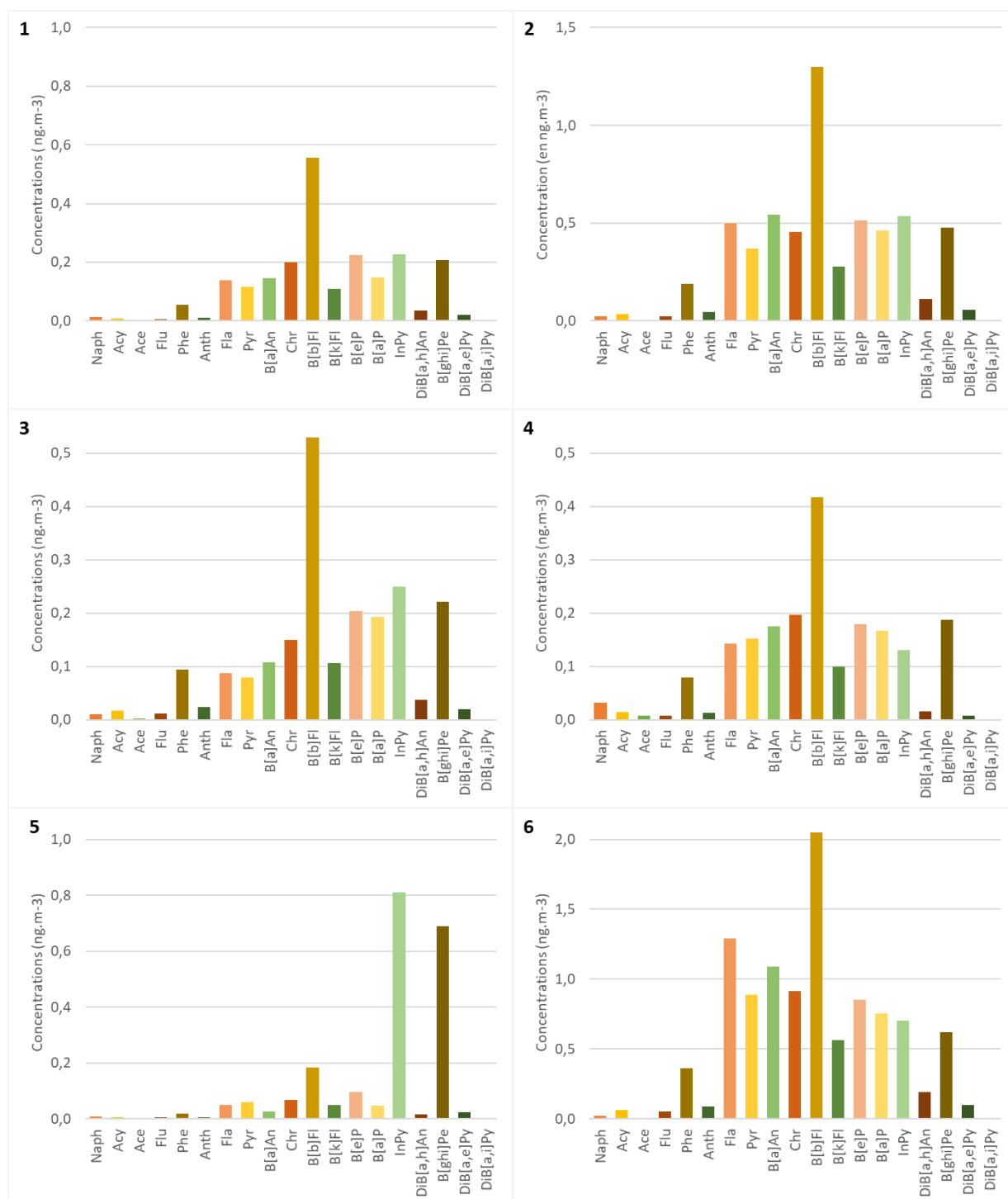


Figure 29 : Profils de concentrations des HAP issus des influences maritime (1), industrielle (2), urbaine (3), trafic routier (4), spécifique maritime (5) et spécifiques industrielle (6) exprimés en moyenne en ng.m⁻³ à des échelles différentes.

Les concentrations totales en oxy- et en nitro-HAP varient selon les sites, allant de 0,51 à 1,85 ng.m⁻³ pour les oxy-HAP, et de 0,21 à 0,39 ng.m⁻³ pour les nitro-HAP (Tableau 21 et Annexe 5). En effet, les concentrations en oxy-HAP sont presque 2 fois supérieures pour les sites sous influence de l'industrie et du trafic routier comparé aux sites sous influence maritime

et urbaine. Toutefois, les sélections d'échantillons sous les influences spécifiques industrielle et maritime sont largement plus concentrées en oxy-HAP. Des phénomènes similaires sont observés pour les nitro-HAP, avec des concentrations plus élevées pour l'extrait sous influence du trafic routier. Ces composés secondaires peuvent se former par nitration électrophile lors de la combustion, notamment des émissions véhiculaires, ce qui peut expliquer la présence plus importante de nitro-HAP sous l'influence du trafic routier. D'autres réactions peuvent avoir lieu avec la phase gazeuse et entraîner des liaisons entre des molécules oxydantes et les HAP, afin de former des oxy- ou des nitro-HAP (Abbas *et al.* 2018).

Tableau 21 : Concentration en oxy-HAP et nitro-HAP dans les PM_{2.5} sous différentes influences (en ng.m⁻³) (LDD : limite de détection ; LDQ : limite de quantification).

Les composés suivants ont été étudiés et leurs concentrations est inférieures à la LDD : 2-nitronaphtalène, 2-nitrofluorène, 6-nitrobenzo(a)pyrène, 1,8-dinitronaphtalène, 1,5-dinitronaphtalène, 3-nitrophénanthrène.

Oxy-HAP	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier	Spécifique Maritime	Spécifique Industrielle
9-Fluorenone	0,031	0,041	0,046	0,078	0,133	0,141
9,10-Anthraquinone	0,152	0,257	0,144	0,254	0,308	0,794
Benzo(a)fluorenone	0,058	0,069	0,049	0,080	0,114	0,143
7H-benz(de)anthracen-7-one	0,186	0,285	0,241	0,342	0,280	0,480
Benz(a)anthracen-7,12-dione	0,080	0,123	0,086	0,108	0,145	0,286
∑ oxy-HAP	0,508	0,775	0,556	0,862	0,979	1,845
Nitro-HAP	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier	Spécifique Maritime	Spécifique Industrielle
1-nitronaphtalène	<LDD	<LDD	0,014	0,004	<LDD	<LDD
2-methyl-1-nitronaphtalène	0,001	0,002	0,001	<LDD	<LDQ	0,010
6-nitrochrysène	<LDD	0,013	<LDD	0,014	<LDD	<LDD
7-nitrobenz(a)anthracène	0,046	0,061	0,032	0,048	<LDQ	<LDD
3-nitrofluoranthène	0,067	0,080	0,050	0,074	0,244	0,220
1-nitropyrène	0,012	0,004	0,005	0,014	<LDD	<LDD
1,3-dinitronaphtalène	<LDD	<LDD	<LDD	0,046	<LDD	<LDD
9-nitroanthracène	0,040	0,033	0,033	0,051	0,126	0,133
2-nitroanthracène	0,084	0,104	0,084	0,137	<LDQ	<LDQ
1,8-dinitropyrène	<LDD	<LDD	0,026	<LDD	<LDD	<LDD
∑ nitro-HAP	0,205	0,298	0,246	0,388	0,370	0,363

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

1.3.2.3. Phtalates et Bisphénol A

La quantité de phtalates observée dans les PM_{2.5} varie en fonction des influences (Tableau 22 et Annexe 6). En effet, la somme des concentrations des différents phtalates étudiés varie entre 1,6 et 6,8 ng.m⁻³. L'influence avec la plus grande concentration de phtalates est liée au trafic routier, suivi de l'influence urbaine (5,2 ng.m⁻³). Les données comparatives pour l'étude des phtalates sont rares. Une étude d'Atmo Hauts-de-France réalisée en 2016-2017 a montré des concentrations de phtalates d'environ 400 ng.m⁻³ pour un site urbain, grâce à l'analyse de 9 composés (DMP, DEP, DnBP, DiBP, BBP, DEHP, DnOP, DiNP, DiDP). Cette étude a également mis en évidence l'importance de la saisonnalité des émissions de phtalates, plus présents durant la période hivernale (Atmo Hauts-de-France 2016). Une étude réalisée au Liban a mis en évidence des concentrations moyennes annuelles de phtalates à environ 100 ng.m⁻³ sur deux sites distincts, en quantifiant 3 composés (DiBP, DnBP, DEHP) (Fadel *et al.* 2021). Les concentrations retrouvées dans le cadre de ce travail sont nettement plus faibles.

Tableau 22 : Quantité de phtalates et de bisphénol A dans les extraits organiques sous les différentes influences (en ng.m⁻³) (LDD : limite de détection).

	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier	Spécifique Maritime	Spécifique Industrielle
Diméthyl phtalate	0,02	0,01	0,05	0,03	<LDD	<LDD
Diéthyl phtalate	0,41	0,43	0,47	0,56	0,34	0,59
Dibutyl phtalate	0,54	0,56	1,10	1,41	0,41	0,42
Benzyl butyl phtalate	0,05	0,04	0,18	0,17	0,02	0,03
Bis(2-ethylhexyl) phtalate	1,30	0,94	3,38	4,67	0,81	0,51
Di-n-octyl phtalate	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD
Σ phtalates	2,32	1,99	5,18	6,84	1,58	1,55
Bisphénol A	0,17	0,32	2,00	0,46	0,05	0,06

Pour le bisphénol A, les concentrations varient entre 0,05 et 2,0 ng.m⁻³ avec une concentration largement supérieure sous l'influence urbaine (Tableau 22).

Les valeurs observées sont cohérentes à celles mesurées lors d'une campagne de mesure réalisées en 2016-2017 par Atmo Hauts-de-France, en milieu industriel et urbain (0,005 à 1 ng.m⁻³, médiane entre 0,1 et 1 ng.m⁻³) (Atmo Hauts-de-France 2016). Encore une fois, les données comparatives et de référence sont extrêmement rares dans la bibliographie.

2. Identification des sources et de leurs contributions

Les modèles sources-récepteurs sont utilisés pour l'étude de la qualité de l'air afin d'obtenir des informations sur les différentes sources de pollution, et de quantifier leurs contributions. Ces outils statistiques sont complexes étant donné le nombre important de variables (Viana *et al.* 2008). La factorisation matricielle positive (PMF) est un modèle source-récepteur qui, à partir d'un jeu de données incluant les concentrations des espèces et leurs incertitudes, va permettre de déterminer les différents profils de sources mais aussi d'estimer la contribution de ces sources à la concentration de PM_{2.5}. La PMF est l'un des modèles d'identification des contributions de sources de PM_{2.5} les plus utilisés (Galvão *et al.* 2020), et nécessite une connaissance minimale des profils de sources (Belis *et al.* 2019).

Le modèle a été développé par Paatero & Tapper (1994), et peut être représenté de la façon suivante :

$$X = G \times F + E$$

X étant la matrice ($n \times m$) de données d'entrée : la matrice de concentrations de m espèces chimiques dans n échantillons

G étant la matrice ($n \times p$) de contribution des sources : avec p le nombre de sources pour n échantillons

F étant la matrice ($m \times p$) de profils de sources : chaque profil de sources est caractérisé par m espèces

E étant la matrice résiduelle qui correspond à la différence entre la valeur de X mesurée et la valeur théorique de G x F obtenue par le modèle.

Aucun échantillon ne peut avoir une contribution négative pour une source. Les profils obtenus doivent être interprétés en les comparant à des profils de sources existant dans la littérature. La base de données SPECIEUROPE par exemple, recense un certain nombre de profils de sources publiés dans la bibliographie (Pernigotti *et al.* 2016).

2.1. Conditions opératoires pour réaliser la PMF

Afin d'utiliser la PMF, il faut généralement avoir un nombre d'échantillons très supérieur aux nombres d'espèces chimiques. Dans ce travail, nous avons une cinquantaine d'échantillons caractérisés par site, ce qui conditionne le nombre d'espèces qu'il est possible de retenir pour effectuer la PMF.

Il a été choisi de considérer les sites sous influence urbaine et trafic routier ensemble, afin d'avoir un nombre d'échantillons plus grand. Cela est possible car les prélèvements ont

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

été faits sur la même période, les deux sites se situent à 10 km l'un de l'autre et ont été soumis *a priori* aux mêmes sources mais avec des contributions différentes.

Une démarche similaire a été mise en place pour les sites sous influence industrielle et maritime. En effet, les prélèvements de particules ont eu lieu en parallèle et il s'agit de deux sites côtiers distants de 34 km. Les essais de la PMF sur les deux sites combinés n'ont pas donné de solution cohérente. Ces deux jeux de données ont donc été considérés individuellement.

Les espèces retenues pour la modélisation sont en première intention identiques pour tous les sites. Il est important de retenir les espèces contribuant le plus à la masse des PM_{2.5}, tels que le carbone total (TC) et les espèces ioniques associées aux sels marins et aux aérosols inorganiques secondaires (Figure 25), afin de reconstruire au mieux la concentration mesurée. De même, l'inclusion d'espèces métalliques connues pour être des traceurs de sources bien connus d'après la bibliographie est primordiale. Toutefois, certaines espèces n'ont plus été considérées dans la PMF après des premiers essais qui montraient une mauvaise reconstruction des concentrations mesurées pour celles-ci. Ceci explique pourquoi le nombre et la nature des espèces considérées peuvent être différents d'un site à l'autre.

Le nombre de sources identifiées correspond à la situation donnant la meilleure solution. Plusieurs scénarii ont été considérés, et seul le meilleur résultat est présenté. Les résultats ont été validés par la reconstruction des espèces, et les outils Bootstrap et DISP qui vérifient la robustesse du modèle, disponibles dans le logiciel PMF.

2.2. Choix des espèces retenues et nombre de sources identifiées selon les jeux de données

Les espèces retenues pour effectuer la PMF, et le nombre de sources identifiées sont résumées dans le Tableau 23. La sélection du nombre d'échantillons et d'espèces chimiques retenues a permis l'identification de 8 sources pour le site sous influence maritime, 9 pour celui sous influence industrielle et 7 pour ceux sous les influences urbaine et trafic routier.

Tableau 23 : Nombre d'échantillons et liste des espèces retenues pour l'obtention du nombre des sources et l'identification des profils par PMF.

TC : Carbone total. La concentration de PM_{2.5} sert au modèle pour ajuster les contributions des sources (leur somme ne peut pas excéder la concentration en PM_{2.5})

		Maritime	Industrielle	Urbaine et Trafic routier
Nombre d'échantillons		47	46	81
Nombre d'espèces		17 + PM _{2.5}	19 + PM _{2.5}	17 + PM _{2.5}
Espèces retenues	Matières carbonées	TC	TC	TC
	Ions hydrosolubles	Na ⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , Ca ²⁺	Na ⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NH ₄ ⁺ , Ca ²⁺	Na ⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺
	Eléments métalliques	Mg, Al, K, Zn, Ti, Cu, Pb, As, Rb, V	Mn, Al, Fe, K, Zn, Ti, Cu, Pb, As, Rb, V, Cd	Mg, Mn, Al, Fe, K, Cu, Pb, As, Rb, Sn, Cd
Nombre de sources identifiées		8	9	7

2.3. Profils de sources identifiés

Les profils de sources ont été identifiés pour chaque influence de PM_{2.5}. Il est possible d'identifier la source d'après les caractéristiques chimiques du profil de sources. Pour les 4 sites, il est mis en évidence des profils présentant des caractéristiques majeures similaires, avec toutefois de légères différences, qui ne remettent pas en cause leur identification. Ceci est lié au fait que la modélisation a été faite séparément sur 3 jeux de données différents, ce qui aboutit à une solution idéale, propre à chacun. Ces profils peuvent être associés à des sources communes de particules constituant le fond atmosphérique. À ces sources de fond viennent s'ajouter des profils de sources locales propres à chacun des sites. Ainsi, au total, 11 profils de sources ont été obtenus. Ceux-ci sont résumés pour chacun des sites sur les Figure 30, Figure 31 et Figure 32, et sont décrites plus en détails ci-après.

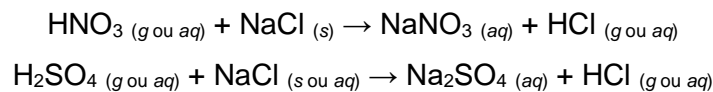
- Les deux premiers profils obtenus peuvent être regroupés comme étant caractéristiques des aérosols inorganiques secondaires. Le premier montre la présence majoritaire de SO₄²⁻ et NH₄⁺ et peut être identifié comme un profil de « sulfates secondaires ». Le deuxième profil contient majoritairement NO₃⁻ et NH₄⁺, ce qui est caractéristique des « nitrates secondaires ». De plus, ces deux profils peuvent contenir des métaux traces tels que K, Pb, Cu et As, ainsi que Cl⁻ et TC. TC est plus présent dans le profil des nitrates secondaires que dans le profil des sulfates secondaires. La présence de TC et des éléments métalliques dans ces profils seraient liée au vieillissement des aérosols inorganiques secondaires, ainsi qu'à leur anthropisation (Cusack *et al.* 2013).

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

- Le troisième profil se caractérise par la présence majoritaire de l'élément Al, et d'autres éléments tels que Fe, Ti, Ca²⁺ et K⁺. Ces éléments sont la signature de l'origine crustale (« poussière crustale »), et notamment des aluminosilicates présents dans le sol (Wedepohl 1995).

- Les deux profils suivants sont liés aux aérosols marins en distinguant les sels marins fraîchement émis, et les sels marins dit « âgés » ou encore appelés anthropisés. Les « sels marins frais » sont caractérisés par la présence de Na⁺, Cl⁻ et Mg²⁺ principalement, dans des proportions similaires à celles trouvées dans l'eau de mer. Ainsi, la valeur du ratio Cl/Na est un indicateur largement utilisé pour qualifier les sels marins. Ce ratio atteint une valeur de 1,8 lorsque les sels marins sont frais et diminue lorsque ceux-ci séjournent dans l'atmosphère en raison des réactions avec les acides atmosphériques aboutissant à la perte de Cl⁻. L'appauvrissement en chlorure est alors compensé par la présence de SO₄²⁻ et NO₃⁻, selon les réactions suivantes (Seinfeld et Pandis 2006 ; Su *et al.* 2022) :



Les profils « sels marins âgés » obtenus contiennent également des éléments tels que K, Pb et V, ce qui montre leur anthropisation. Le vanadium a déjà pu être identifié comme étant un traceur du transport maritime, notamment par la combustion de fiouls lourds des bateaux (Sippula *et al.* 2007).

- Le sixième profil est un profil de combustion. Il est caractérisé par la forte proportion de TC qui est libéré durant les processus de combustion (notamment le carbone élémentaire). La présence de NO₃⁻ et/ou d'éléments tels que Cu, Zn et Fe peuvent refléter la combustion liée au trafic automobile, tandis que la présence de K peut refléter la combustion de la biomasse. Dans notre cas, le K est toujours détecté, ce qui est la raison pour laquelle le profil est appelé « combustion dont biomasse ». L'analyse du lévoglucosane aurait permis de distinguer plus spécifiquement la combustion de biomasse des autres sources de combustion (Fadel *et al.* 2023 ; Simoneit *et al.* 1999).

- Le septième profil correspond à la combustion de fioul lourd, et est caractérisé principalement par la présence de V et Ni (Sippula *et al.* 2007). Dans notre étude, Ni n'a pas été retenu après les premiers essais dû à sa mauvaise reconstruction, notamment par la présence de données inférieures à la LDD combiné au faible nombre d'échantillons. La « combustion de fioul lourd » peut être reliée aux émissions des bateaux ou aux activités industrielles, notamment les raffineries. Étant donné la situation géographique des sites de prélèvement de particules, les combustions de fioul lourd proviennent plus probablement des

émissions de bateaux. En effet, le détroit du Pas-de-Calais est empruntée quotidiennement pas plus de 400 navires commerciaux, sans compter les navires de pêche et de plaisance (CROSS Gris-Nez 2020). Ces profils sont observés uniquement sur les sites sous influence maritime et industrielle.

- Le huitième profil est marqué par la présence de TC associé à des éléments métalliques issus de l'usure des pièces automobiles (Cu) (Amato *et al.* 2009 ; Thorpe et Harrison 2008). Il est attribué au « trafic routier ». Toutefois, sous l'influence industrielle, le profil n'a pas été identifié clairement et n'a pu être isolé, mais il pourrait être inclus dans les profils « combustion » et « riche en métaux ».

- Le neuvième profil se caractérise par la présence essentiellement de métaux et peut refléter partiellement une contribution industrielle ou des éléments émis lors de l'usure de pièces automobiles en mouvement, tels les disques et plaquettes de frein, l'embrayage et les pneus (Hleis *et al.* 2013 ; Thorpe et Harrison 2008). Il a été nommé « riche en métaux » et contribue très peu à la concentration de PM_{2.5}.

- Les deux derniers profils ont été identifiés uniquement sur le site sous influence industrielle. Ils sont relatifs aux émissions de l'aciérie intégrée. Le profil « aciérie intégrée – Cheminée cuisson agglomération » est caractérisé par la présence majoritaire de K et Cl, ainsi que de métaux traces tels que Pb et Rb. Ce profil a été caractérisé précédemment sur le site industriel de Dunkerque et correspond aux émissions en sortie de cheminées de l'unité d'agglomération des minerais (Hleis *et al.* 2013 ; Kfoury *et al.* 2016). Le profil « aciérie intégrée – Émissions diffuses » correspond aux émissions globales du site (hors cheminées) qui comprend notamment les hauts fourneaux, l'unité d'agglomération et l'aciérie. Ces émissions diffuses sont caractérisées par la présence très importante de Fe, Ca²⁺ du calcaire, tous deux issus de l'unité d'agglomération. D'autres métaux moins abondants peuvent provenir des matériaux fondants, ou du coke et des matériaux recyclés utilisés pour préparer les aciers (Zn, Ti, Cu, Pb, V, Cd) ou d'impuretés présents dans les matières premières (Hleis *et al.* 2013).

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

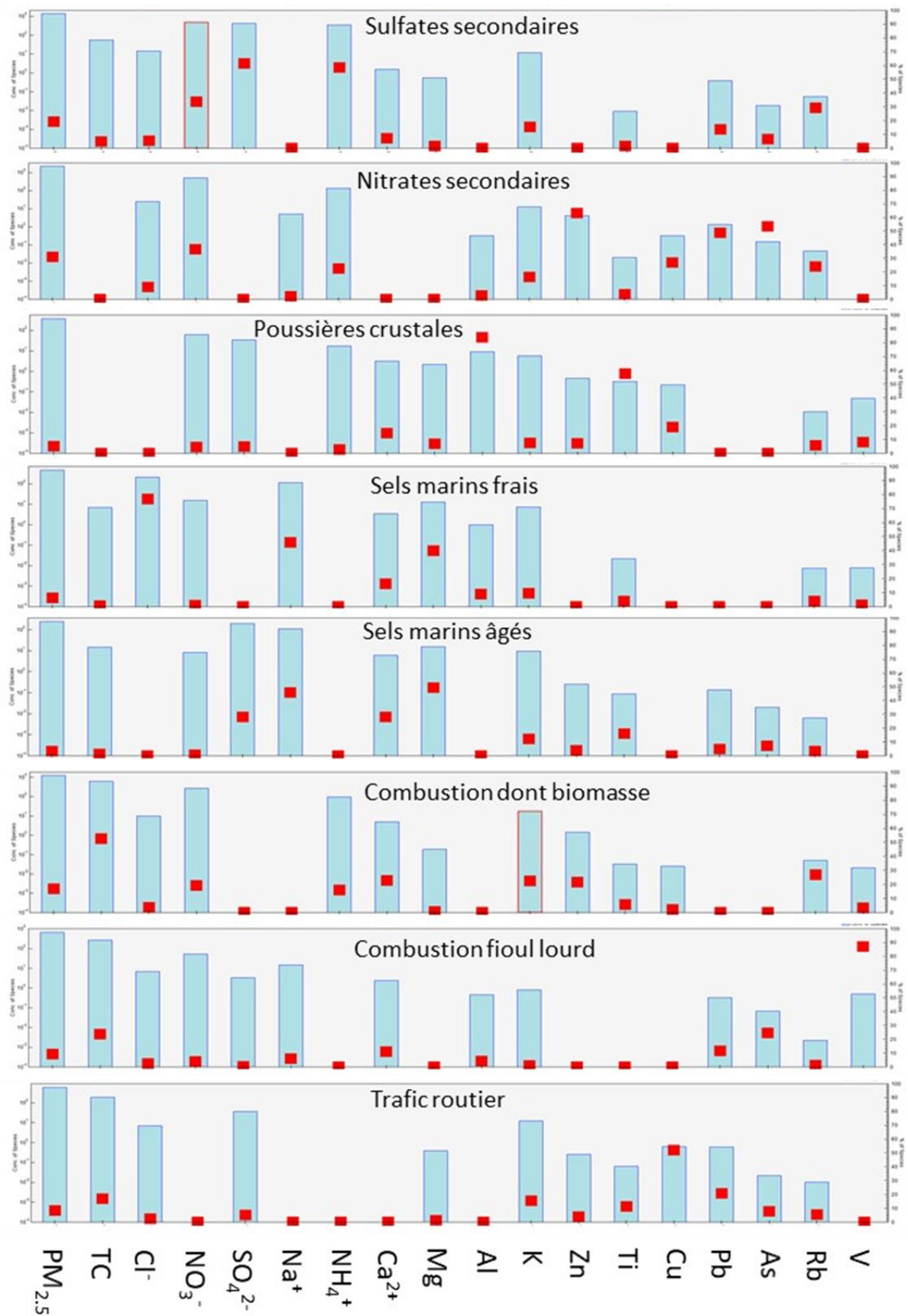


Figure 30 : Profils des sources de PM_{2.5} collectées sur le site sous influence maritime

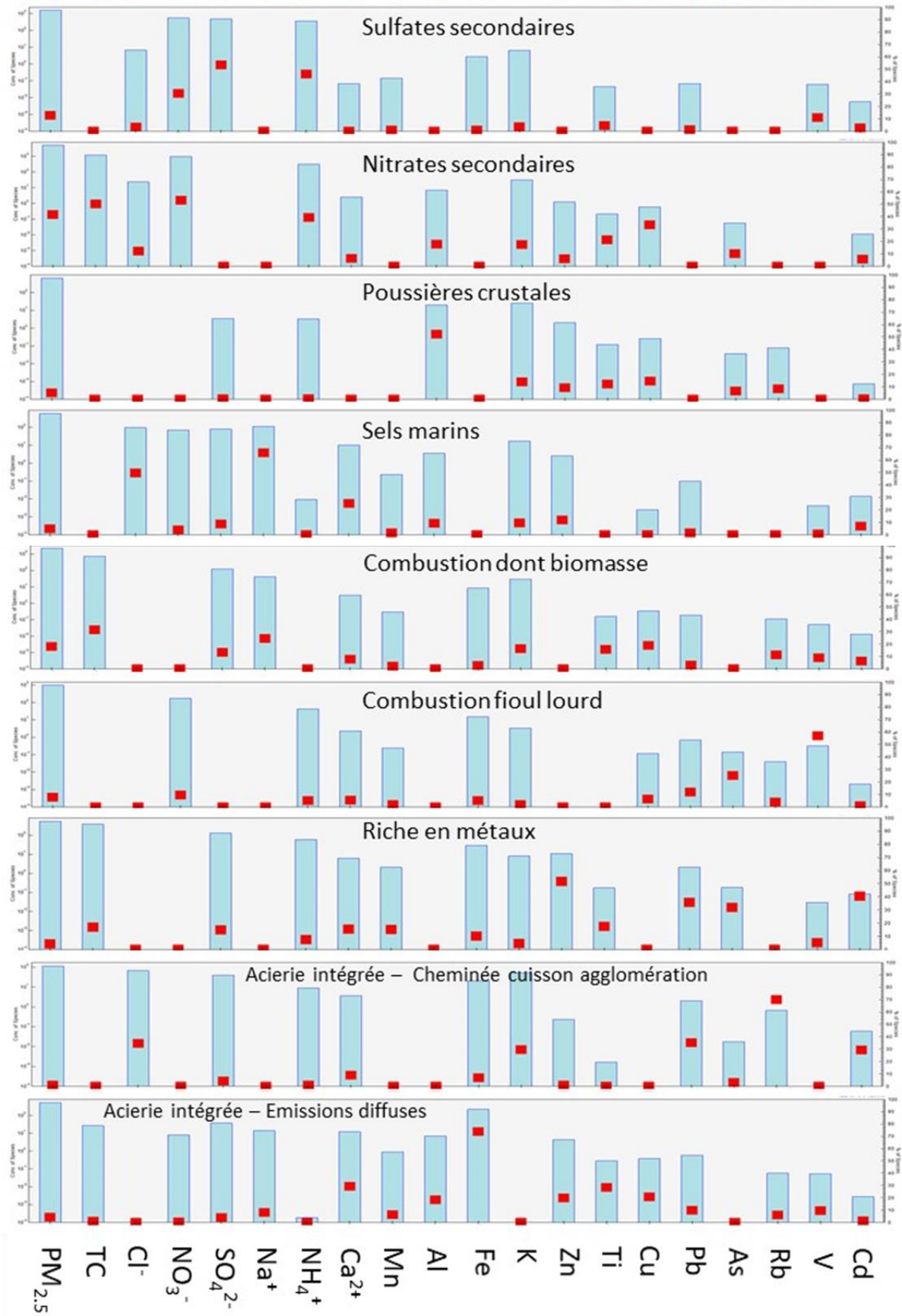


Figure 31 : Profils des sources de PM_{2.5} collectées sur le site sous influence industrielle

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

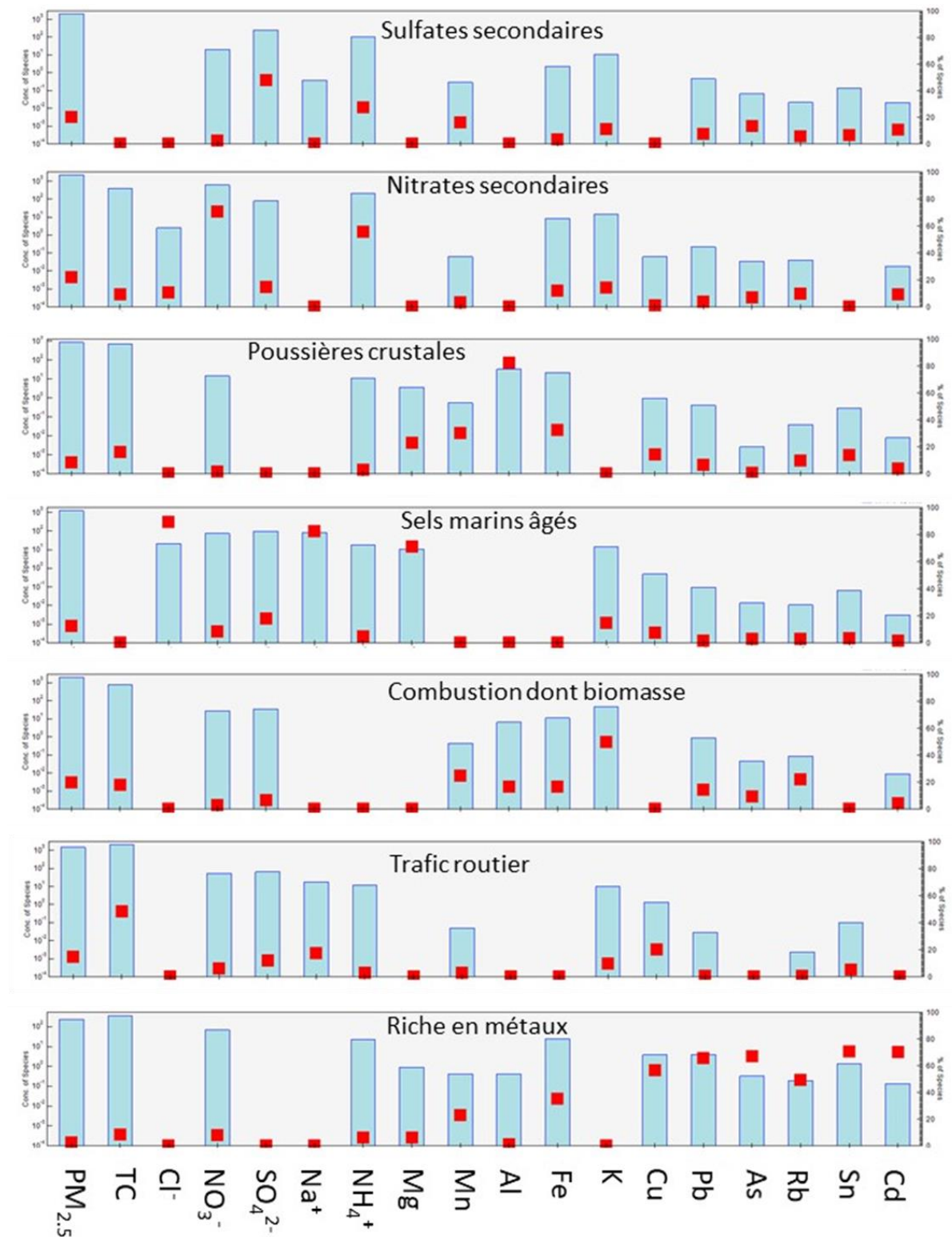


Figure 32 : Profils des sources des éléments de PM_{2.5} collectées sur les sites sous influences urbaine et trafic routier

2.4. Contributions des sources

Les contributions moyennes des différentes sources de PM_{2.5} identifiées sur les 4 sites sont résumées dans le Tableau 24 et la Figure 33. Les résultats montrent que les aérosols secondaires représentent globalement entre 40 %, pour le site trafic routier, et 57,8 %, pour le site sous influence industrielle, des contributions de sources pour les influences non spécifiques. Les sources de combustion comprenant « combustion dont biomasse », « combustion fioul lourd » et « trafic routier », prennent également une part majeure dans les contributions de sources de nos PM_{2.5}. Lorsque l'on ajoute ces 3 sources de combustions aux sources d'aérosols secondaires, 71,5 à 85,9 % des niveaux de PM_{2.5} sont expliqués. La part restante est liée aux contributions des « sels marins », des « poussières crustales » et industrielles, soit 14 à 29 % de la masse des PM_{2.5}.

Sur le site sous influence maritime, les PM_{2.5} sont reliées à 48,5 % aux aérosols secondaires, à 18,5 % à la « combustion dont biomasse », à 9,9 % à la « combustion de fioul lourd », et à 9,6 % aux sels marins. La proportion de « sels marins frais » (6,3 %) est plus importante que celle des « sels marins âgés » (3,3 %), ce qui est cohérent avec la position de ce site sur la côte. La part de PM_{2.5} expliquée par les émissions des bateaux est de 9,9 % pour le site toutes directions de vent confondues, tandis que le trafic routier est responsable de 7,9% des PM_{2.5}.

Nous pouvons constater que la sélection d'échantillons pour l'influence spécifique maritime donne une contribution plus élevée en sels marins, au détriment de la source « combustion dont biomasse ». La source de « combustion fioul lourd » attribuable aux émissions des bateaux est légèrement plus élevée (12,9 % contre 9,9 %). Il semble que le groupement d'échantillons ciblant les émissions maritimes et portuaires, reflète plutôt l'influence d'un fond maritime. En effet, le site de prélèvement se situe sur un secteur largement ouvert sur la mer, avec la Manche et la Mer du Nord. Les valeurs observées sur la même période sur le site de Dunkerque qui est très proches (7%) confirment cette hypothèse. La contribution du « trafic routier » est également plus élevée pour l'échantillon sous influence spécifique. Ceci pourrait être lié aux émissions des véhicules entrant et sortant des bateaux (roll-on/roll-off) qui peuvent s'avérer importants dans le port de Calais.

Ces résultats sont cohérents avec une étude précédente réalisée à Calais et au Cap Gris-Nez, un site à proximité du détroit du Pas-de-Calais. En effet, cette étude démontre pour le site de Calais, avec des prélèvements réalisés de février à avril, que les concentrations en aérosols secondaires sont la première source de contributions des PM₁₀ (36,3 %), suivi par les sels marins (27,2 %) et la combustion de biomasse (20,9 %). La combustion de fioul lourd correspond à 5,6 % seulement de cette contribution. Sur le site de Cap-Gris-Nez, les

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

contributions annuelles sont similaires, avec en premier les aérosols secondaires (30,4 %), suivi par les sels marins (36,9 %). Les fiouls lourds représentent 5,3 % seulement de cette contribution (Roche 2019).

Concernant la sélection d'échantillons retenus pour le spécifique maritime et portuaire, un examen *a posteriori* montre que les échantillons sélectionnés initialement d'après les critères de vent ne donnent pas forcément les contributions les plus élevées avec la source « combustion fioul lourd ». En effet, les évolutions chronologiques de la contribution combustion fioul lourd, donnée en Annexe 7 montrent que les contributions journalières sont globalement très faibles pour tous les échantillons sur la période d'étude : le site a donc été exposé de manière faible à ces émissions. Il faut souligner que, durant la période, nous avons été très peu soumis à des vents soufflant directement depuis la direction des bateaux dans le port. Ceci confirme l'hypothèse émise sur le fait que nous avons probablement échantillonné majoritairement un fond maritime (comprenant les émissions des bateaux) plutôt que ponctuellement les émissions des bateaux.

L'influence industrielle est l'influence avec la plus grande contribution en aérosols secondaires, avec notamment 44,7 % de contribution des « nitrates secondaires » et 13,1 % des « sulfates secondaires ». La « combustion dont biomasse » explique 16,5 % des concentrations en PM_{2.5}. Les contributions industrielles « riches en métaux » et les deux contributions « aciérie intégrées » représentent 9,7 % des contributions de sources pour ce site. Pour l'influence spécifique industrielle, un changement très marqué dans les contributions est visible. En effet, les aérosols secondaires ne représentent plus que 16,1 % des contributions de sources, et les contributions industrielles représentent 37,9 %.

De plus, l'évolution chronologique des contributions industrielles (Annexe 8) montre clairement que nous avons retenu les échantillons avec les contributions industrielles les plus importantes, alors que cette sélection a été basée uniquement sur les directions de vents et les teneurs en Fe et Ca²⁺.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus sur le site industriel à une étude réalisée auparavant sur le même site, on observe que nos données sont cohérentes. En effet, les auteurs trouvent des concentrations d'aérosols secondaires proche de 50 %, et de combustion à 44 % de contribution de la concentration des PM_{2.5} (Kfoury *et al.* 2016). Les contributions spécifiques aux industries Dunkerquoises représentaient 1,9 % de la concentration des PM_{2.5} sur la période de novembre à décembre, et 1,2 % sur la période de mars à avril. Toutefois, la concentration de PM_{2.5} lors de ces échantillonnages était 2 à 3 fois supérieure, avec 24,9 et 34,2 µg.m⁻³ pour les deux périodes respectivement. Il est possible de comparer les résultats à la contribution en µg.m⁻³, les valeurs de notre étude sont autour de 1,3 µg.m⁻³ pour les

contributions de sources industrielles, et pour l'étude précédente, elles sont proche à 0,47 et 0,41 µg.m⁻³ pour les périodes de novembre à décembre et de mars à avril respectivement.

Pour les sites sous influence urbaine et trafic routier, les aérosols secondaires contribuent à 45,6 % et 40 % de la concentration des PM_{2.5} respectivement. Les valeurs des sources de « combustion dont biomasse » sont également très proches, avec 22,5 % pour l'influence urbaine et 17,3 % pour l'influence trafic routier. De la même manière, le trafic routier explique 15,2 % des PM_{2.5} sur le site sous influence urbaine, contre 14,3 % sur le site sous influence trafic routier. Globalement, les contributions des sources de ces deux sites sont très proches, ce qui est synonyme d'un fond urbain. Les deux sites sont situés tous deux dans des agglomérations, et l'on est globalement sous l'influence d'un fond urbain, avec une part liée au trafic légèrement supérieure sur le site de Roubaix (Annexe 9 et Annexe 10).

Des études ont été réalisées auparavant sur la ville de Lens, mais sur des PM₁₀ (Waked *et al.* 2014). Cette étude a montré pour une période similaire une faible représentation des aérosols secondaires (23 %), une contribution importante des sels marins (35 %) et des sources de combustion de biomasse (25 %). La part du trafic routier est estimée à 4 % seulement. Ces différences avec nos résultats peuvent être liées à la taille des PM (PM₁₀ contre PM_{2.5} pour nous), au fait que les particules n'ont pas été échantillonnées sur les mêmes périodes et sous des conditions météorologiques différentes. Une autre étude réalisée à Nice sur des PM_{2.5} prélevées dans un tunnel, permet de dresser un profil de source trafic routier, mais les résultats ne sont pas comparables à une étude réalisée dans un espace atmosphérique multi-sources comme le nôtre (Fabretti *et al.* 2009). Enfin, une étude réalisée à Marseille met en avant les différentes contributions de sources sur un site urbano-industriel (Salameh *et al.* 2018). Ce site est idéal pour être comparé à un autre site urbano-industriel tel que Dunkerque, mais ne convient pas à l'étude comparative d'une agglomération non-industrielle. Ainsi, très peu d'études sont disponibles pour obtenir des contributions de sources à partir de PM_{2.5} sur des sites urbains, comparable à notre étude.

L'identification et l'estimation des contributions de sources de PM_{2.5} a pu être réalisée sur les 4 sites retenus pour cette étude. A l'issue de l'étape de caractérisation chimique des PM_{2.5}, nous pouvons confirmer que les influences visées sur les différents sites de prélèvements ont bien été prélevées.

Chapitre 3

Caractéristiques des PM_{2.5} des 4 influences

Tableau 24 : Contributions moyennes des sources de PM_{2.5} sur les 4 sites sous influence maritime et portuaire, industrielle, urbaine et du trafic routier, ainsi que sous influences spécifiques (µg.m⁻³).

Sources	Contributions moyennes (µg.m ⁻³)					
	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic routier	Spécifique maritime	Spécifique industrielle
PM _{2.5}	7,4	13,0	9,8	10,6	4,8	9,1
Sulfates secondaires	1,3	1,7	2,2	1,9	0,5	0,7
Nitrates secondaires	2,3	5,5	2,3	2,3	1,7	0,8
Poussières crustales	0,4	0,7	0,5	1,2	0,3	0,3
Sels marins		0,6				1,1
Sels marins frais	0,5				0,3	
Sels marins âgés	0,2		1,1	1,5	0,5	
Combustion dont biomasse	1,4	2,2	2,2	1,8	1,4	2,2
Combustion fioul lourd	0,7	0,5			0,7	0,5
Trafic routier	0,6		1,5	1,5	0,5	
Riche en métaux		0,6	0,1	0,4		0,6
Acierie intégrée – Cheminée cuisson agglomération		0,1				0,4
Acierie intégrée – Émissions diffuses		0,5				2,4

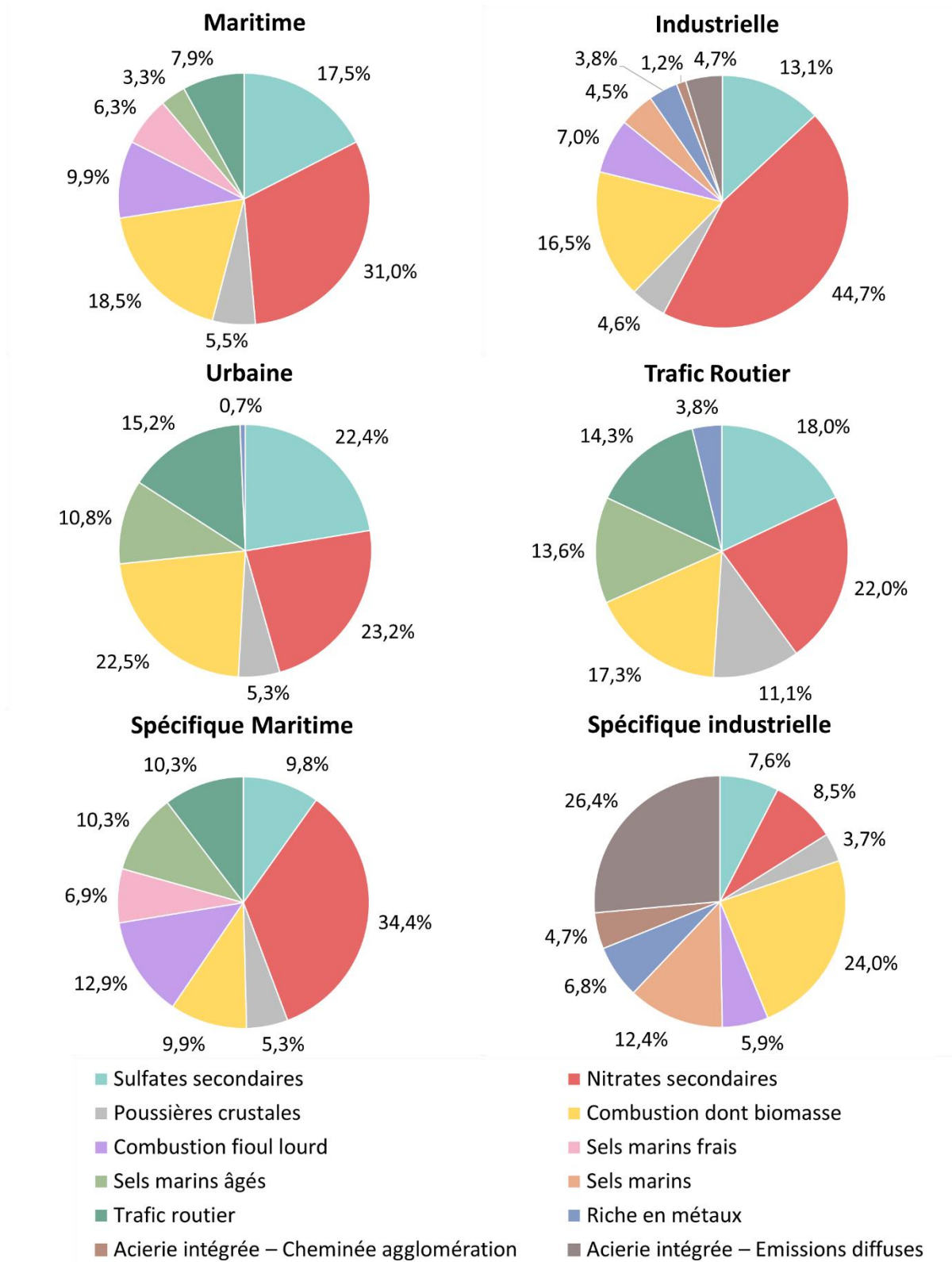


Figure 33 : Contributions moyennes des PM_{2.5} sur les 4 sites sous influences maritime, industrielle, urbaine et du trafic routier, ainsi que sous influences spécifiques (%).

Chapitre 4 :
Étude des mécanismes de réponses
induits par les PM_{2.5}

Chapitre 4 : Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

1. Étude de la cytotoxicité sur les cellules pulmonaires des PM_{2.5} selon les 4 influences

Les effets des extraits sous forme organiques et hydrosolubles de particules fines ont été étudiés sur des cellules pulmonaires. Pour cela, des cellules A549 (ATCC CCL-185), une lignée épithéliale d'adénocarcinome alvéolaire, et des cellules BEAS-2B (ATCC CRL-9609), des cellules épithéliales bronchiques immortalisées, ont été exposées aux extraits de PM_{2.5} pendant 24, 48 et 72 heures à des concentrations de 1, 2, 5, 10, 25, 50 et 100 µg eq PM.cm⁻² dans des plaques 96 puits à la concentration de 10⁴ cellules.cm⁻². Ces expositions ont été réalisées dans le but d'obtenir les CL₅₀, 50 % de mortalité des cellules, des différents extraits. A partir de ces résultats, la CL₁₀ a été déterminée et servira de concentration pour l'étude des mécanismes d'inflammation, de stress oxydant et de métabolisation des xénobiotiques. De plus, une autre concentration 10 fois inférieure sera utilisée afin d'avoir des concentrations qui sont plus proches des concentrations environnementales.

Pour vérifier la toxicité des particules sur ces 2 types cellulaires, 3 tests ont été utilisés : un test de mortalité cellulaire qui quantifie la LDH extracellulaire, un test de viabilité cellulaire qui quantifie l'ATP présent dans les cellules, et un test de prolifération cellulaire qui vérifie le pouvoir réducteur des cellules. Ces 3 tests ont été réalisés afin de vérifier la complémentarité des résultats. En effet, les expositions aux PM_{2.5} sont connues pour induire la mort cellulaire sans rupture membranaire (Peixoto *et al.* 2017), ce qui pourrait entraîner une mauvaise interprétation des résultats avec une lecture uniquement à partir de la mesure de la LDH.

Les résultats de viabilité cellulaire sont donnés dans le Tableau 25. Les CL₅₀ ont été calculées grâce à l'activité ATP par un modèle de régression non-linéaire (modèle de Hill). Ces résultats montrent que les cellules BEAS-2B sont plus sensibles que les cellules A549.

En effet, pour chaque extrait organique, les valeurs de CL₅₀ des cellules BEAS-2B sont inférieures à 50 µg eq PM.cm⁻², alors que pour les cellules A549, les valeurs sont supérieures ou aux alentours de 100 µg eq PM.cm⁻². Les extraits hydrosolubles donnent des valeurs de CL₅₀ supérieures à celles des extraits organiques sur les cellules BEAS-2B, supérieures à 50 µg eq PM.cm⁻². Pour les cellules A549, aucune cytotoxicité n'a été observée à 100 µg eq PM.cm⁻². Ainsi, l'extrait hydrosoluble est moins cytotoxique que l'extrait organique et les cellules BEAS-2B sont plus sensibles que les cellules A549. Cette baisse de viabilité semble augmenter avec le temps d'exposition.

De plus, pour les cellules BEAS-2B, les extraits les plus cytotoxiques sont respectivement les extraits organiques issus du site sous influence maritime, puis ceux des

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

sites sous influence industrielle et du trafic routier, et enfin l'extrait sous influence urbaine. Pour les extraits hydrosolubles, l'extrait sous influence maritime est le plus cytotoxique, suivi par les influences urbaine et du trafic routier, puis enfin l'influence industrielle.

Pour les cellules A549, plus résistantes aux extraits organiques et hydrosolubles, des tests complémentaires ont été réalisés jusqu'à 150 et 200 µg eq PM.cm⁻² pendant 24, 48 et 72 heures uniquement sur les extraits organiques. Ces tests ont confirmé des valeurs de CL₅₀ supérieures à 100 µg eq PM.cm⁻² et inférieures à 200 µg eq PM.cm⁻², excepté pour l'influence industrielle après 24 heures d'exposition.

Tableau 25 : CL₅₀ des différents extraits organiques et hydrosolubles sur les cellules A549 et BEAS-2B, estimées à partir de la viabilité cellulaire (n= 3).

	CL ₅₀ (µg eq PM.cm ⁻²)	Maritime	Industrielle	Urbaine	Trafic Routier
A549 Extrait organique	24h	>100	>100	>100	>100
	48h	>100	>100	>100	>100
	72h	>100	>100	93,2	98,7
BEAS-2B Extrait organique	24h	36,7	44,7	51,6	44,4
	48h	30,3	34,2	40,4	33,1
	72h	29,1	30,2	33,6	29,3
A549 Extrait hydrosoluble	24h	>100	>100	>100	>100
	48h	>100	>100	>100	>100
	72h	>100	>100	>100	>100
BEAS-2B Extrait hydrosoluble	24h	55,4	>100	>100	>100
	48h	52,2	>100	60,6	60,2
	72h	50,9	>100	55,2	51,6

Concernant la mortalité cellulaire évaluée par la libération de la LDH, on constate qu'aux doses testées (1 - 200 µg eq PM.cm⁻²), elle n'excède pas les 10 % quel que soit le temps d'exposition (24, 48 ou 72 heures), de manière identique pour les cellules A549 et BEAS-2B. À la plus forte dose d'exposition (100 µg eq PM.cm⁻²) pour les cellules BEAS-2B, on observe la plus grande mortalité. Celle-ci est de 10,8% en moyenne pour la fraction organique sous influence du trafic routier après 24h d'exposition. Ainsi, il n'y a pas ou très peu de mortalité cellulaire par rupture membranaire, quels que soient nos échantillons, le temps d'exposition ou le modèle cellulaire.

Pour le test de prolifération cellulaire avec le test Alamar Blue, qui est souvent assimilé à un test de viabilité cellulaire, nous retrouvons la même tendance que pour les mesures de viabilité cellulaire basées sur la mesure d'ATP intracellulaire.

Ces résultats semblent similaires aux résultats visibles dans la bibliographie. En effet la mortalité cellulaire par rupture membranaire que nous retrouvons lors de la nécrose ne

semble pas se produire ici suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}, même à de fortes doses d'exposition. Au contraire, les cellules perdent en viabilité, non seulement par la diminution de la quantité d'ATP, mais aussi par une diminution de la prolifération *via* la diminution du potentiel rédox intracellulaire. En effet, le taux de mortalité n'excède pas 10 %, alors que la viabilité cellulaire a diminué jusqu'à 30 % dans les conditions les plus délétères. Ces résultats convergent vers les observations de Peixoto *et al.* (2017), qui mettent en avant l'induction de nécrose cellulaire à très forte concentration de PM_{2.5} et l'induction de l'autophagie et d'apoptose à des concentrations moyennes et faibles, respectivement.

Pour la suite des expérimentations, nous avons choisi les doses de 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² car il s'agit de valeurs proches de la CL₁₀. Ces concentrations sont proches de concentrations utilisées dans d'autres études (Barker *et al.* 2014 ; Dysart *et al.* 2014 ; Gualtieri *et al.* 2012a ; Longhin *et al.* 2018 ; Longhin, Gualtieri, *et al.* 2016 ; Yang *et al.* 2017) et vont nous permettre d'étudier la réaction des cellules exposées aux composés organiques et hydrosolubles des particules. Les réactions les plus communément étudiées sont l'inflammation, le stress oxydant et la réponse antioxydante qui en découle, ainsi que la métabolisation des composés organiques (Badran, Ledoux, *et al.* 2020 ; Ghio *et al.* 2012 ; Gualtieri *et al.* 2017).

2. Réponse inflammatoire induite par les extraits de PM_{2.5}

La réponse inflammatoire est un des mécanismes les plus connus de toxicité médiée par les particules. Cette réponse inflammatoire produit des médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines. Les cytokines étudiées ici sont le tumor necrosis factor-α (TNF-α), l'interleukine-1β (IL-1β), l'interleukine-6 (IL-6) ainsi que l'interféron-γ (IFN-γ). Ces cytokines sont connues pour être induites suite à l'exposition aux PM_{2.5} (Fuentes-Mattei *et al.* 2010 ; Leclercq *et al.* 2018 ; Leikauf *et al.* 2020 ; Valavanidis *et al.* 2013) et certaines d'entre elles sont liées à l'activation de certains mécanismes de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (Doerner et Zuraw 2009 ; Imai *et al.* 2019 ; Sullivan *et al.* 2009) qui a été étudiée par la suite.

Les cytokines ont été quantifiées par test ELISA sandwich, dans le surnageant de culture des cellules A549 et BEAS-2B exposées aux extraits organique et hydrosoluble des PM_{2.5} à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻², pendant 6 et 24 heures. Pour s'assurer de la surexpression ou sous-expression de ces cytokines, leur expression génique a également été quantifiée par RT-qPCR.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

2.1. TNF- α

Le niveau de sécrétion de cytokine TNF- α a été mesuré par méthode ELISA. L'exposition aux extraits de PM_{2.5} a abouti à des résultats inférieurs à la limite de quantification, pour les deux types cellulaires, aux deux concentrations d'exposition. Deux études montrent que la quantité de TNF- α sécrétée par les cellules BEAS-2B est trop faible pour être quantifiée par ELISA (Méausoone *et al.* 2021 ; Øya *et al.* 2019).

L'expression relative du gène TNF- α n'a pas montré de résultats de C_q inférieurs à 35 cycles pour les cellules A549 exposées aux extraits organiques et hydrosolubles. Des valeurs de C_q>35 ne doivent pas être prises en compte car le gène n'est pas suffisamment exprimé pour être quantifié correctement. L'expression du gène n'est donc pas induite pour ces cellules. Pour les cellules BEAS-2B, la cytokine est induite en présence de LPS, ce qui montre que ces cellules sont capables d'induire cette cytokine. Cependant, deux conditions d'exposition aux extraits de PM_{2.5} ont induit significativement cette cytokine : l'exposition à l'extrait hydrosoluble de l'influence industrielle à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ pendant 6 heures et l'exposition à l'extrait organique sous influence trafic routier pendant 24 heures à la plus forte concentration (Tableau 26).

Tableau 26 : Expression génique de TNF- α , calculée selon la méthode $\Delta\Delta\text{C}_q$ (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert la sous-expression (RQ<0,5).

				BEAS-2B	
				Extraits organiques	Extraits hydrosolubles
				RQ \bar{x}	RQ \bar{x}
Témoin positif : LPS	6h	7,9 \pm 0,3	8,2 \pm 0,7		
	24h	7,4 \pm 0,6	9,5 \pm 2,6		
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,2 \pm 0,3	0,7 \pm 0,0	
		Industriel	1,3 \pm 0,0	4,0 \pm 0,4	
		Urbain	1,4 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	
		Trafic routier	1,5 \pm 0,6	0,7 \pm 0,1	
	24h	Maritime	2,0 \pm 0,5	1,3 \pm 0,1	
		Industriel	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	
		Urbain	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	
		Trafic routier	5,0 \pm 1,3	1,1 \pm 0,0	
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,0 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	
		Industriel	1,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3	
		Urbain	1,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	
		Trafic routier	1,4 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	
	24h	Maritime	1,3 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0	
		Industriel	1,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	
		Urbain	1,5 \pm 0,5	1,1 \pm 0,4	
		Trafic routier	1,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,7	

La cytokine TNF- α a pu être étudiée à plusieurs reprises sur le modèle cellulaire A549, avec des réponses variées : aucune modulation de la cytokine après 24 heures d'exposition à 12 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de PM_{2.5} issues des influences urbaine-traffic routier (Perrone *et al.* 2010) ; ou une augmentation dose dépendante à 5 et 24 heures d'exposition aux PM_{2.5} issues des influences urbaine et trafic routier à fortes concentrations (60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Calcabrini *et al.* 2004). Sur le modèle cellulaire BEAS-2B, l'induction génique de la voie TNF- α a été démontrée suite à l'exposition à des PM_{2.5} d'hiver à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pendant 24 heures (Longhin, Capasso, *et al.* 2016). Il est évident que la modulation de cette cytokine va dépendre de la composition des PM_{2.5} et aucun élément spécifique de leur composition n'a encore été identifié comme étant un inducteur de TNF- α .

2.2. IL-1 β

L'étude de l'interleukine-1 β a été réalisée sur le niveau de cytokine pro-inflammatoire libérée dans le surnageant de culture cellulaire à l'aide de tests ELISA. La réponse des deux modèles cellulaires est différente.

Tableau 27 : Présence de l'interleukine-1 β supérieur à la limite de quantification (LDQ) pour les cellules A549 exposées aux extraits organiques et hydrosolubles de PM_{2.5} (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (+ : valeur > LDQ ; - : valeur \leq LDQ)

			A549	
			Extraits organiques	Extraits hydrosolubles
Témoin positif : LPS		6h	-	-
		24h	-	-
10 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$	6h	Maritime	+	+
		Industriel	+	-
		Urbain	-	+
		Trafic routier	+	-
	24h	Maritime	-	-
		Industriel	-	-
		Urbain	-	-
		Trafic routier	-	-
1 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$	6h	Maritime	-	-
		Industriel	-	-
		Urbain	-	-
		Trafic routier	+	-
	24h	Maritime	-	-
		Industriel	-	-
		Urbain	-	-
		Trafic routier	-	-

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

En effet, les cellules A549 ont induit des concentrations basales d'IL-1 β inférieures à la LDQ du test. Le témoin positif LPS n'a pas induit de réponse supérieure à la LDQ. Toutefois, certains échantillons ont augmenté la sécrétion d'IL-1 β à des niveaux supérieurs à la LDQ et sont décrits dans le Tableau 27. Cette interleukine semble être présente de manière plus importante après 6 heures d'exposition, aux extraits organiques sous influence maritime, industrielle et trafic routier aux plus fortes concentrations, et l'influence trafic routier à la plus faible concentration, mais également aux extraits hydrosolubles sous influences maritime et trafic routier aux plus fortes concentrations. La présence de la cytokine est vérifiée par ses concentrations supérieures à la LDQ, à l'inverse du témoin qui ne présente aucune concentration supérieure à la LDQ. Il n'est pas possible de présenter les résultats de la même manière que pour les autres cytokines, car aucune quantification par rapport au témoin n'est possible. Toutefois, l'augmentation de la cytokine est vérifiée grâce à sa quantification pour les extraits précédents.

Pour les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques, la présence de DMSO n'a pas d'impact sur la sécrétion d'IL-1 β car aucune variation du niveau d'IL-1 β n'est visible. L'évolution de la concentration des cytokines est mesurable au niveau basal, et une augmentation est visible après 24 heures d'exposition au témoin positif (Figure 34). Les extraits organiques n'ont pas induit de réponse significativement différente dans la libération d'IL-1 β à 6 ou 24 heures, aux deux doses d'exposition. Cependant, les extraits hydrosolubles diminuent significativement les concentrations en IL-1 β à 6 heures pour les extraits sous influence maritime et urbaine, et semblent induire des augmentations non-significatives à 24 heures pour ces deux influences aux deux concentrations.

L'expression génique de IL-1 β est présentée dans le Tableau 28. Les réponses induites sont différentes en fonction du type cellulaire. En effet pour les cellules A549, les extraits sous forme organique semblent être les seuls à induire l'expression d'IL-1 β , notamment après 24 heures d'exposition pour les influences industrielle et trafic routier aux deux concentrations.

Pour les cellules BEAS-2B la surexpression de l'interleukine est visible principalement après 24 heures d'exposition, et semble induite de façon similaire par les extraits organiques et hydrosolubles. Après 24 heures d'exposition à la concentration de 10 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$, les quatre extraits hydrosolubles, et les extraits organiques sous influences maritime et industrielle induisent l'expression d'IL-1 β . Pour la concentration de 1 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ les extraits organiques et hydrosolubles sous influence industrielle, et les extraits organiques urbain et du trafic routier induisent l'expression d'IL-1 β . Certaines influences induisent l'expression de cette cytokine dès 6 heures d'exposition, notamment les extraits sous influence industrielle et du trafic routier.

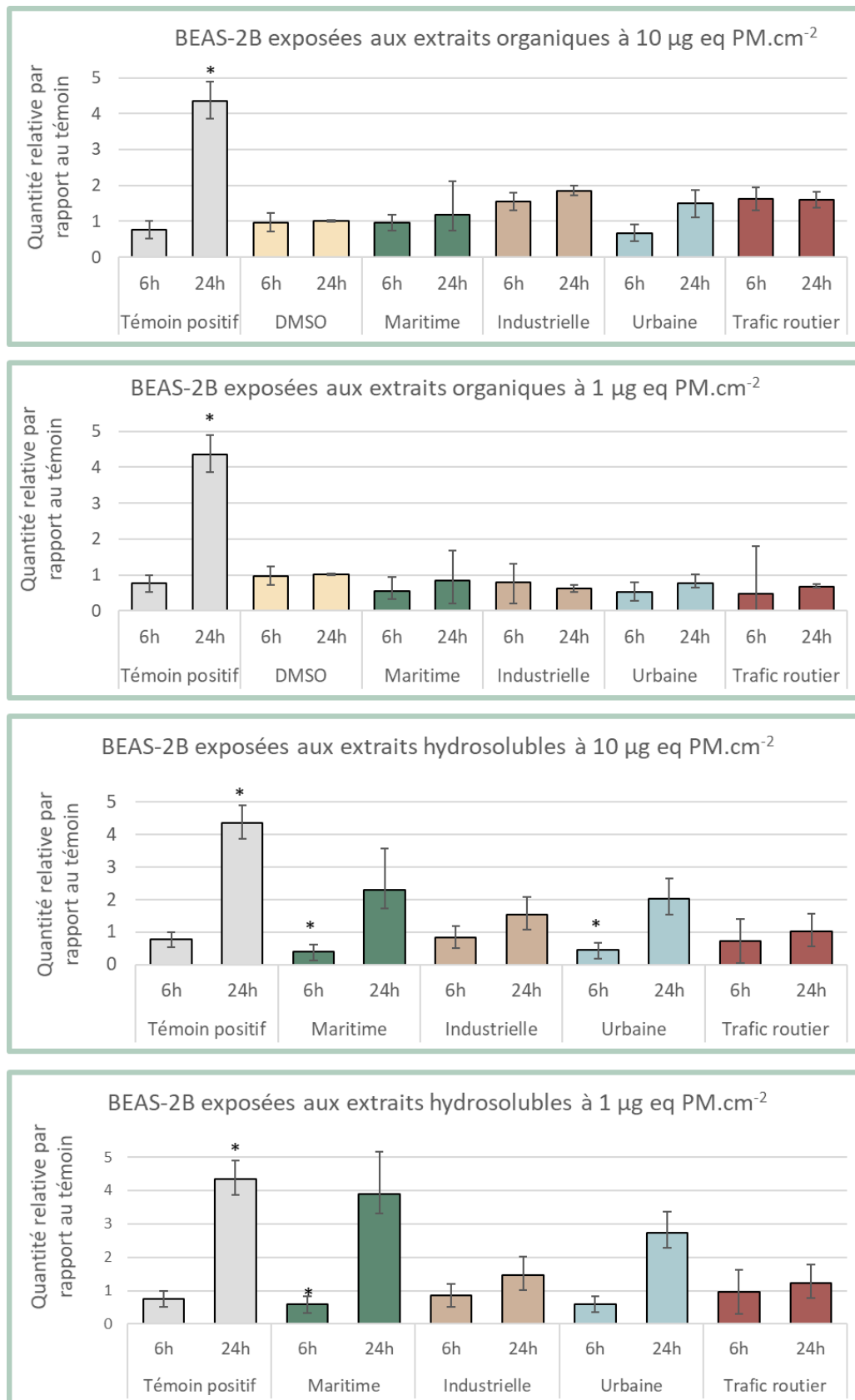


Figure 34 : Induction cytokinique de l'interleukine-1β par rapport au témoin, par des cellules BEAS-2B exposées à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² d'extraits organiques et hydrosolubles pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (* : p<0,05 test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn)

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Tableau 28 : Expression génique de IL-1 β , calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules A549 et BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549		BEAS-2B		
		Extraits organiques	Extraits hydrosolubles	Extraits organiques	Extraits hydrosolubles	
		RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	
Témoin positif : LPS	6h	1,2 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	5,2 \pm 0,4	
	24h	1,7 \pm 0,4	2,0 \pm 0,3	2,8 \pm 0,4	5,5 \pm 1,7	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,0	1,9 \pm 0,3	1,4 \pm 0,0
		Industriel	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	1,6 \pm 0,8	5,7 \pm 0,3
		Urbain	1,4 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,0	1,4 \pm 0,3
		Trafic routier	2,0 \pm 0,5	1,2 \pm 0,1	1,6 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4
	24h	Maritime	2,0 \pm 0,5	1,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	3,7 \pm 0,0
		Industriel	2,1 \pm 0,4	1,2 \pm 0,2	3,0 \pm 0,5	3,7 \pm 0,4
		Urbain	1,9 \pm 0,3	1,4 \pm 0,3	1,8 \pm 0,4	3,6 \pm 0,9
		Trafic routier	5,0 \pm 1,3	1,7 \pm 0,1	2,4 \pm 1,0	4,4 \pm 0,2
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,2 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2
		Industriel	1,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	2,4 \pm 0,0	0,9 \pm 0,3
		Urbain	1,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
		Trafic routier	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	2,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,1
	24h	Maritime	2,1 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5	1,1 \pm 0,0
		Industriel	2,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	3,2 \pm 1,1
		Urbain	1,7 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,0	2,1 \pm 0,4
		Trafic routier	2,9 \pm 0,4	1,4 \pm 0,7	3,5 \pm 0,7	2,4 \pm 1,7

Certaines études ont mis en évidence l'activation de la cytokine IL-1 β par les PM_{2.5} (Jia *et al.* 2021 ; Xu *et al.* 2020). Toutefois, Yang *et al.* (2016) n'ont pas réussi à détecter la présence de cytokines sécrétées par des cellules BEAS-2B après 24 heures d'exposition à des extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Toutefois, le gène IL-1 β était fortement induit en fonction du site de prélèvement des particules (Yang *et al.* 2016). Une seconde étude sur des cellules BEAS-2B a observé l'augmentation protéique d'IL-1 β par des extraits organiques de PM_{2.5} à des concentrations de 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 24 heures. L'étude montre une concentration faible dans l'échantillon témoin, mais une augmentation dans les échantillons exposés aux différents extraits de PM_{2.5} (Fuentes-Mattei *et al.* 2010).

2.3. IL-6

La réponse cytokinique en IL-6 après expositions aux extraits organiques et hydrosolubles de particules à deux doses d'exposition sont présentées sur la Figure 35 et la Figure 36. L'ajout du témoin positif entraîne l'augmentation de la sécrétion de la cytokine IL-6 pour l'ensemble des échantillons, indépendamment du type cellulaire et du type d'extraction. Pour les deux types cellulaires exposés aux extraits organiques, la présence de DMSO n'a pas modifié la sécrétion d'IL-6. Pour la plupart des échantillons d'extraits testés, la sécrétion des cytokines n'a pas été modulée. Il est possible d'observer des modifications significatives de concentration en IL-6 uniquement à la plus forte concentration (10 µg eq PM.cm⁻²) des extraits organiques et hydrosolubles pour les deux types cellulaires.

Dans un premier temps, l'effet des composés organiques à 10 µg eq PM.cm⁻² sur les cellules A549 montre une augmentation significative de sécrétion par rapport au témoin, pour l'échantillon issu du trafic routier après 24 heures d'exposition. Sur le deuxième type cellulaire, BEAS-2B, il y a des diminutions significatives de la concentration d'IL-6 par rapport au témoin sur les échantillons exposés 6 heures aux influences maritime et industrielle, ainsi qu'à 24 heures pour cette dernière.

Les composés organiques auraient un effet inducteur sur la sécrétion d'IL-6 pour les cellules A549 exposées 24 heures à l'influence du trafic routier et plutôt inhibiteur pour les cellules BEAS-2B exposées aux influences industrielle et portuaire.

Dans un deuxième temps, nous remarquons que l'effet des composés hydrosolubles est moindre sur les cellules A549. Aucune induction ou inhibition de la cytokine IL-6 n'est visible sur ce modèle cellulaire. Pour les cellules BEAS-2B, une inhibition significative de la cytokine IL-6 est visible après 6 et 24 heures d'exposition uniquement pour les extraits sous influence industrielle.

Les extraits de PM_{2.5} ont tendance à ne pas moduler la sécrétion d'IL-6. La surexpression de la cytokine pro-inflammatoire n'est pas visible suite à l'exposition aux extraits organiques et hydrosolubles pour les deux types cellulaires et pour les deux concentrations d'extraits testés, à l'exception d'un échantillon. En effet, l'échantillon organique sous influence trafic routier a été le seul à induire une production significative de l'IL-6 sur les cellules A549 après 24 heures d'exposition.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

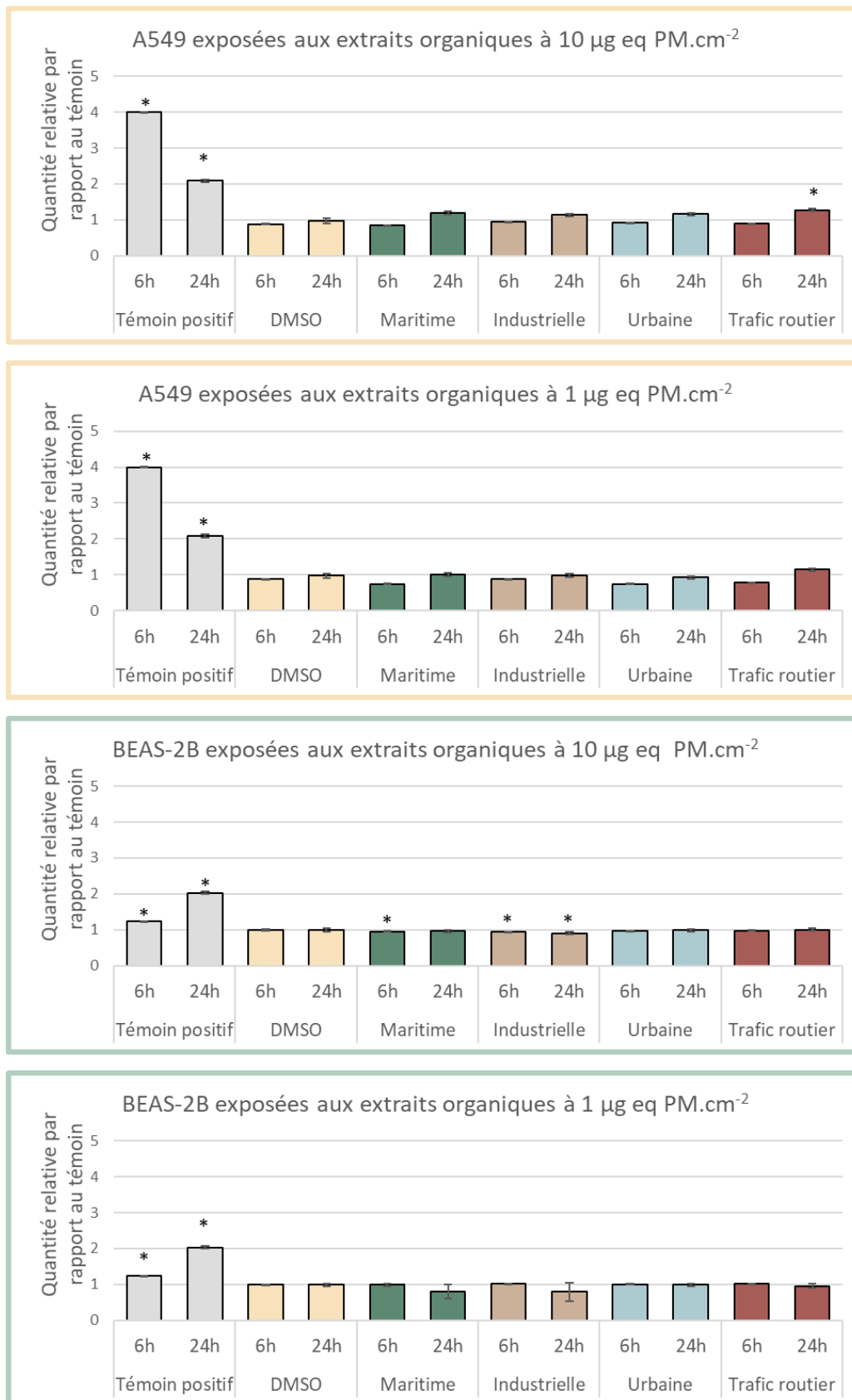


Figure 35 : Induction cytokinique de IL-6 par rapport au témoin, par des cellules A549 et BEAS-2B exposées à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² d'extraits organiques pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 répliquats biologiques). (* : p<0,05 test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn)

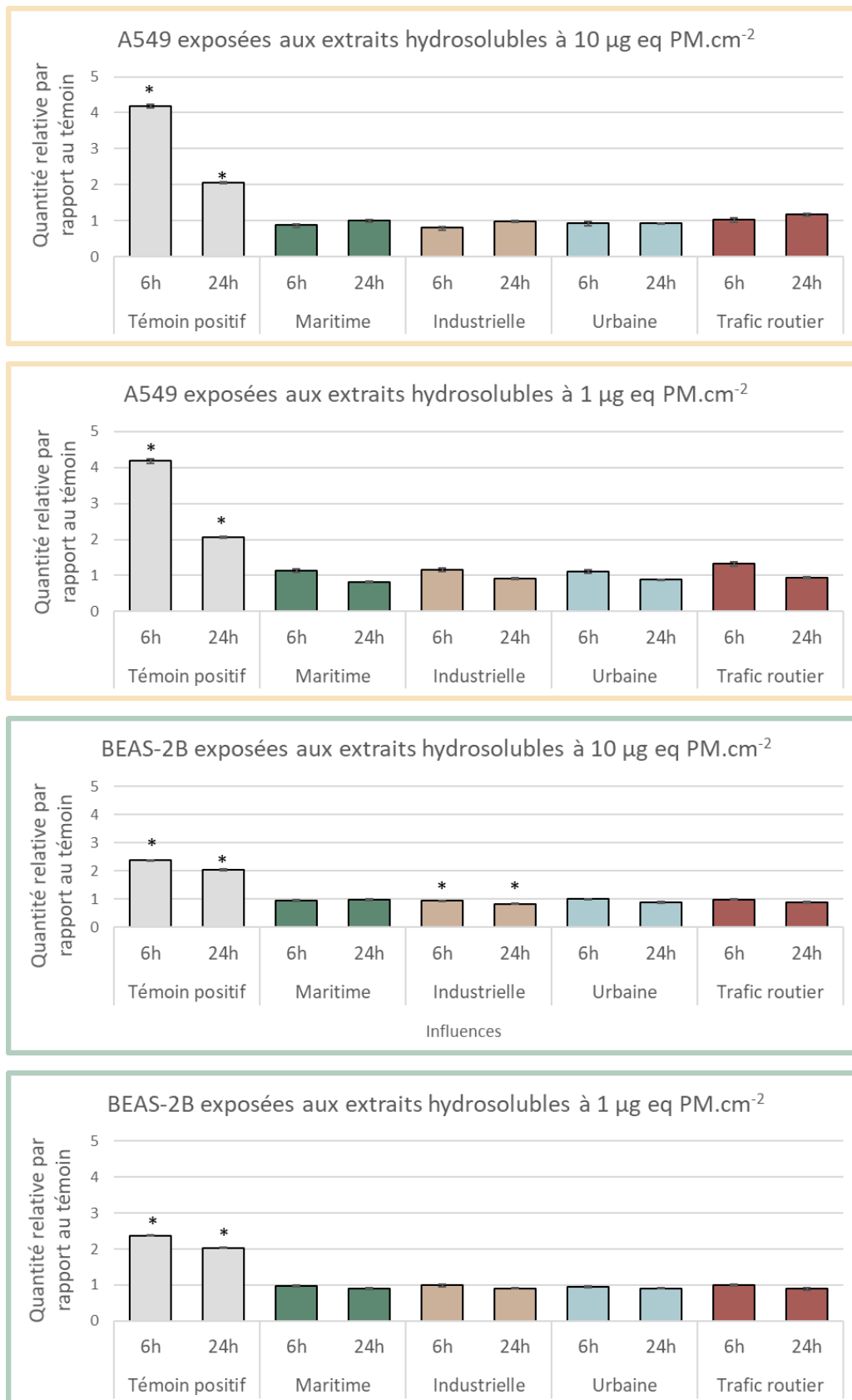


Figure 36 : Induction cytokinique de l'interleukine-6 par rapport au témoin, par des cellules A549 et BEAS-2B exposées à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² d'extraits hydrosolubles pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). (* : p<0,05 test Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn)

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

L'inhibition et l'activation de ce médiateur peuvent avoir lieu au niveau génique, c'est pour cela que son expression génique a également été étudiée. Les résultats obtenus sont décrits dans le Tableau 29. Il est possible de voir dans un premier temps que les cellules A549 n'induisent pas le gène d'IL-6 suite à l'exposition au LPS, témoin positif d'inflammation. Cet effet a déjà été observé dans plusieurs études (Grandel *et al.* 2009 ; Relja *et al.* 2014). La réponse ne semble pas non plus induite par les différents extraits organiques et hydrosolubles.

Pour les cellules BEAS-2B, le témoin positif induit significativement l'IL-6. Toutefois, les extraits organiques et hydrosolubles ne semblent pas induire l'expression de la cytokine à l'exception d'un échantillon. En effet, il est possible d'observer une unique induction du gène, pour l'influence industrielle en extrait hydrosolubles après 24 heures d'exposition.

Tableau 29 : Expression génique de l'interleukine-6, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), dans les cellules A549 et BEAS-2B exposées aux deux types d'extraits, à 1 et 10 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$ pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549		BEAS-2B		
		Extraits organiques	Extraits hydrosolubles	Extraits organiques	Extraits hydrosolubles	
		RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	RQ \bar{x}	
Control positif : LPS	6h	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	5,7 ± 0,8	7,2 ± 0,6	
	24h	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	10,8 ± 1,5	14,5 ± 4,5	
10 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,6 ± 0,0
		Industriel	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,4
		Urbain	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0	0,6 ± 0,2
		Trafic routier	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,8 ± 0,9	0,5 ± 0,2
	24h	Maritime	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,3	1,1 ± 0,1
		Industriel	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1
		Urbain	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3
		Trafic routier	2,3 ± 0,9	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1
1 $\mu\text{g eq PM}\cdot\text{cm}^{-2}$	6h	Maritime	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,4	0,7 ± 0,0
		Industriel	0,6 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2
		Urbain	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1
		Trafic routier	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,7 ± 0,0
	24h	Maritime	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
		Industriel	1,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,0	2,3 ± 0,9
		Urbain	1,3 ± 0,0	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,7
		Trafic routier	2,1 ± 0,6	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,9

L'interleukine-6 est très couramment utilisée dans l'analyse de la réponse inflammatoire suite à l'exposition aux PM_{2.5} (Perrone *et al.* 2010 ; Pozzi *et al.* 2003 ; Sun *et al.* 2018), mais nos résultats ne montrent pas d'induction forte de ce médiateur. Les réponses cellulaires semblent similaires avec, pour la plupart, aucun changement dans la quantité de cytokines sécrétées ou dans la modulation du gène.

Au contraire, pour les cellules BEAS-2B sa concentration extracellulaire a tendance à être diminuée. Une seule influence a entraîné l'augmentation de la sécrétion de cette cytokine : l'influence du trafic routier sous forme d'extrait organique, uniquement sur les cellules A549. Pour l'expression génique, une unique induction a été observée pour l'influence industrielle hydrosoluble, à la plus faible concentration, après 24 heures d'exposition.

Des résultats semblables avec soit, une absence de modulation d'IL-6, soit une modulation variable selon la saisonnalité des prélèvements de particules, ont pu être observés après des temps d'exposition aux PM_{2.5} similaires. Perrone *et al.* (2010) observent une absence de modulation d'IL-6 après exposition à différentes PM_{2.5} à des concentrations proches des nôtres (12 µg.cm⁻²), pendant 24 heures sur des cellules A549. Manzano *et al.* (2016) observent des réponses variables pour IL-6 après exposition au PM_{2.5} sur le même modèle. D'autres auteurs ont trouvé que la réponse des cellules A549 pour cette interleukine était modulée en fonction du temps et de la dose d'exposition, avec une réponse nettement supérieure après 48 et 72 heures d'exposition aux PM_{2.5}. Toutefois, leurs doses d'expositions étaient aussi nettement supérieures, allant de 30 à 60 µg.cm⁻² (Calcabrini *et al.* 2004). Pour les cellules BEAS-2B, la modulation de cette cytokine peut intervenir également plus tardivement avec notamment une augmentation des cytokines sécrétées après 72 heures d'exposition (Leclercq *et al.* 2017).

2.4. IFN-γ

La mesure de sécrétion de cytokine IFN-γ a été réalisée par méthode ELISA. L'exposition aux extraits de PM_{2.5} a abouti à des résultats inférieurs à la LDD, pour les deux types cellulaires.

L'expression relative du gène IFN-γ n'a pas montré de résultat de C_q inférieur à 35 cycles pour les deux types cellulaires. Ainsi, l'expression du gène n'est pas quantifiable pour ces cellules.

Cette cytokine pro-inflammatoire a déjà pu être observée dans les cellules pulmonaires humaine (Fagerberg *et al.* 2014), notamment les cellules BEAS-2B, et a été induite significativement suite à l'exposition au BaP (Abbas *et al.* 2019). Toutefois, IFN-γ est connue comme étant produite majoritairement par les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et les cellules *Natural killer*. Leur rôle est d'induire la réponse cytokinique des interleukines et de TNF-α (Burke et Young 2019 ; Cavillon 2018). De plus, cette cytokine participe à l'induction du mécanisme de TEM (Imai *et al.* 2019), mécanisme qui a été étudié par la suite.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

3. Stress oxydant et réponse antioxydante suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}

Les cellules humaines sont soumises en permanence à un stress oxydant extérieur, plus particulièrement pour les cellules pulmonaires qui sont en contact permanent avec O₂ lors des échanges gazeux. Ainsi, les cellules sont capables de s'adapter en maintenant une balance entre ERO et réponse antioxydante. De nouveaux tests permettent d'observer le potentiel oxydant de certains composés, et ainsi prévoir leur potentiel impact sur les cellules. Ces méthodes estiment les capacités d'oxydoréduction des extraits de particules, et donc la présence d'ERO. D'autres tests cellulaires permettent d'évaluer la réponse antioxydante des cellules, notamment par l'activation d'enzymes antioxydantes.

3.1. Potentiel oxydant – réponse acellulaire

L'évaluation du potentiel oxydant a été effectuée grâce à deux tests : le test à l'acide ascorbique (OP-AA) et le test au dithiothréitol (OP-DTT). Ainsi, les extraits organiques et hydrosolubles de chaque site ont pu être testés.

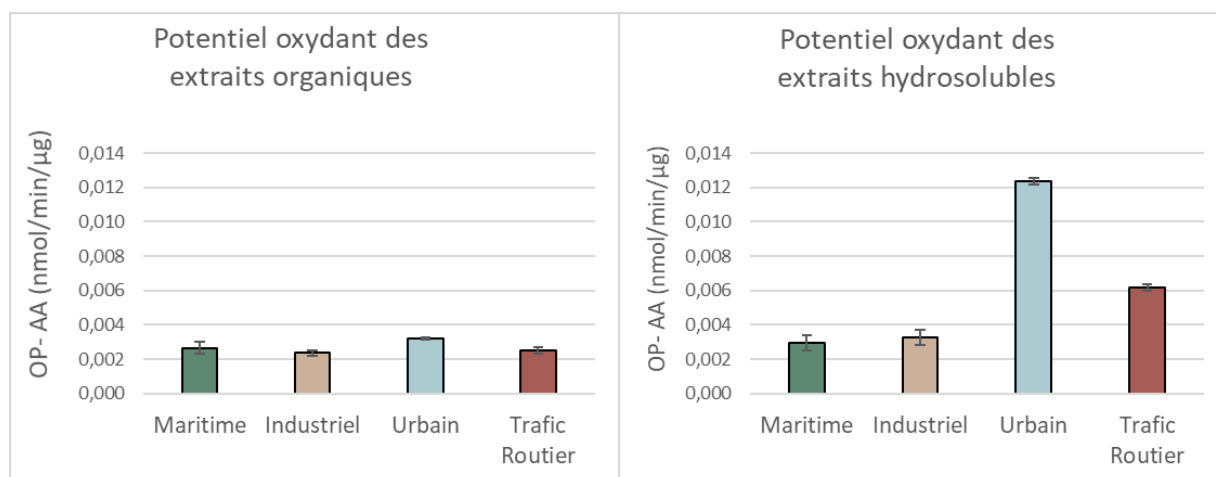


Figure 37 : Potentiel oxydant (OP) des extraits hydrosolubles et organiques obtenus par la méthode à l'acide ascorbique (n=3).

La Figure 37 représente les valeurs du potentiel oxydant obtenues par le test OP-AA normalisées par rapport à la masse ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) pour les extraits organiques et hydrosolubles. On peut observer alors les différences de valeurs pour les différents extraits. En effet, les extraits hydrosolubles semblent avoir des valeurs de potentiel oxydant plus élevées que les extraits organiques, notamment pour les échantillons sous influences urbaine et du trafic routier.

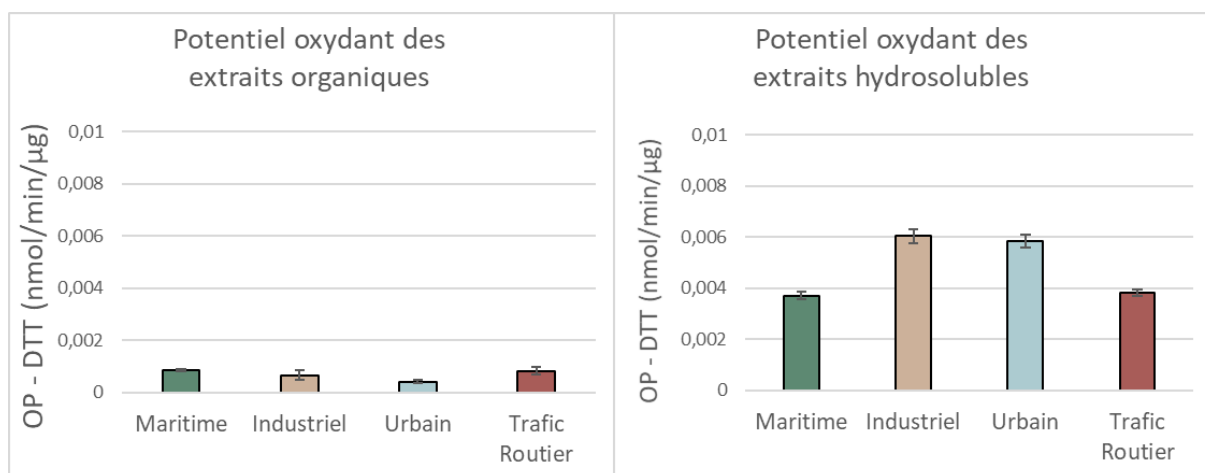


Figure 38 : Potentiel oxydant (OP) des extraits hydrosolubles et organiques obtenus selon la méthode au dithiothréitol (n=3).

La Figure 38 représente les valeurs du potentiel oxydant obtenues avec le test OP-DTT normalisées par rapport à la masse pour les extraits organiques et hydrosolubles. Ces extraits montrent encore une fois des réponses différentes. Les extraits hydrosolubles ont une réponse plus marquée, avec en moyenne des niveaux 5 fois supérieurs aux niveaux des extraits organiques. Cette fois, l'échantillon industriel hydrosoluble semble être le plus oxydant parmi tous les échantillons.

Le test au DTT est plus sensible pour les métaux tandis que le test AA est sensible plus largement pour les composés organiques et les métaux (Fadel 2021).

Ainsi, nos résultats montrent pour OP-AA un potentiel oxydant plus fort pour l'échantillon urbain hydrosoluble. Des résultats d'OP similaires ont été retrouvés sur des sites urbains à Paris, Atlanta (États-Unis), et Sarno (Italie) (Cesari *et al.* 2019 ; Dong Gao, Mulholland, *et al.* 2020 ; Jedynska *et al.* 2017). Une étude a comparé sites urbain et industriel, et a obtenu des valeurs de potentiels oxydants pour OP-AA plus grande pour le site industriel que pour le site urbain (Pietrogrande *et al.* 2018). Ces différences peuvent s'expliquer par les spécificités des sites. En effet, l'industrie de cette étude (industrie de galvanisation au trempé de Zn) est différente de l'industrie dunkerquoise, et les espèces présentes sur le site industriel de cette dernière étude peuvent être plus oxydantes que celles du site de Dunkerque.

Pour les extraits organiques, les valeurs d'OP-AA sont similaires pour les 4 influences. Bien que les HAP plus présents dans l'extrait sous influence industrielle n'ont pas augmenté cette réponse.

Les résultats d'OP-DTT montrent des valeurs supérieures pour les échantillons d'extraits hydrosolubles, avec des valeurs 2 à 4 fois supérieures aux échantillons d'extraits

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

organiques. Les échantillons sous influence industrielle et urbaine possèdent les plus grandes valeurs d'OP-DTT. Le site industriel de Dunkerque a déjà été analysé pour l'étude du potentiel oxydant (Moufarrej *et al.* 2020), et plusieurs composés métalliques, ainsi que les sources de contribution industrielles de ce site, ont été corrélées aux résultats de valeurs de potentiel oxydant par le test au DTT. En effet, les extraits hydrosolubles sont connus pour contenir des métaux tels que Mn et Fe (Landkocz *et al.* 2017). Ces métaux étant omniprésents sur le site industriel de Dunkerque, ils pourraient être la cause de valeurs élevée du potentiel oxydant de ce site, spécifiquement.

D'autres espèces n'ont pas été étudiées dans l'analyse chimique des PM_{2.5}, comme les composés organiques hydrosolubles, qui sont connus pour participer au potentiel oxydant. Parmi ces espèces, on retrouve notamment les quinones et les acides humiques (Bates *et al.* 2019 ; Dong Gao, Godri Pollitt, *et al.* 2020 ; Jiang *et al.* 2020 ; Lin et Yu 2019 ; Ma *et al.* 2018).

3.2. Réponse antioxydante cellulaire

Les PM_{2.5} sont largement connues pour leur impact oxydant sur les cellules. Plusieurs enzymes antioxydantes sont capables d'éliminer les ERO. Ces enzymes sont décrites sur la Figure 39. Brièvement, une défense antioxydante est assurée par la transformation de deux molécules de GSH et de H₂O₂ en GSSG. Par ailleurs, les enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) permettent l'élimination de O₂[•] et H₂O₂ respectivement. Il existe trois familles de SOD (SOD1, SOD2, et SOD3), qui ont des domaines catalytiques différents : Cu/Zn pour SOD1 et SOD3 ; un domaine α N-terminal et α/β C-terminal pour SOD2. NQO1 permet l'élimination des quinones mais, dans ce processus, O₂[•] peut être formé soit par la formation d'HQ, soit par l'intermédiaire des semi-quinones qui peuvent également induire la formation d'ERO. NQO1 peut être activé par la voie Nrf2 mais aussi par la voie AhR (Ross et Siegel 2017, 2021). HMOX1 est une enzyme qui va détoxifier les hèmes avec des groupements oxydants. Cette enzyme est induite par la voie Nrf2 (Lau *et al.* 2008).

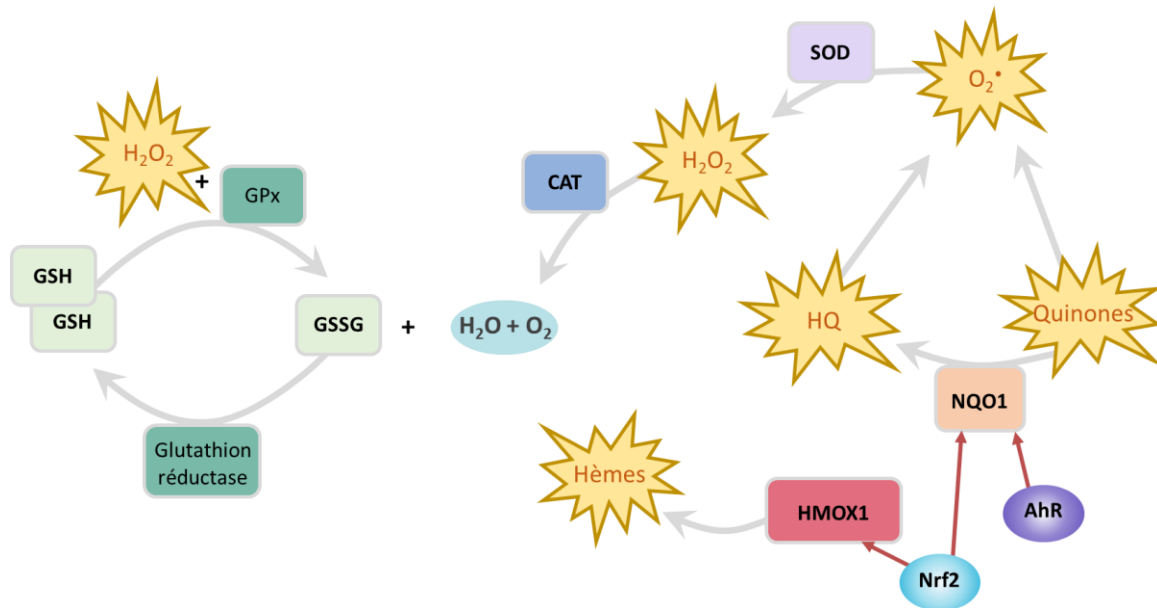


Figure 39 : Défenses enzymatiques antioxydantes et facteurs de transcriptions impliqués (flèches grises : les réactions enzymatiques ; flèches rouges : les enzymes induites par les différents facteurs de transcription)

3.2.1. Oxydation du glutathion

Parmi les enzymes antioxydantes on peut retrouver la glutathion peroxydase. Celle-ci agit en présence d'ERO et peut transformer de deux glutathions réduits (GSH) en un glutathion oxydé (GSSG). La quantification du glutathion réduit et oxydé (par l'intermédiaire du glutathion total) a été réalisée et figure sous forme de ratio GSH/GSSG normalisé par rapport au témoin. La diminution du ratio par rapport aux cellules témoins signifie alors que le stress oxydant augmente.

Sur la Figure 40, on observe pour les expositions des cellules A549 aux extraits organiques de PM_{2.5}, une diminution du ratio GSH/GSSG à 24 heures, puis une augmentation du ratio à 48 heures, par rapport au témoin. Ces changements sont significatifs, notamment pour la diminution du ratio à 24 heures pour les expositions à la plus petite concentration d'extraits organiques sous influences industrielle et du trafic routier. Plus précisément, les résultats montrent une augmentation significative des valeurs de GSSG. Au contraire, à 48 heures, l'augmentation du ratio pour l'influence urbaine provient d'une augmentation significative de GSH.

Pour l'exposition aux extraits hydrosolubles sur les cellules A549 (Figure 40), très peu de modulation du ratio GSH/GSSG est observable. Une diminution est visible uniquement pour l'échantillon exposé 24 heures à 10 µg eq PM.cm⁻² de l'extrait maritime, due à une augmentation significative de GSSG.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

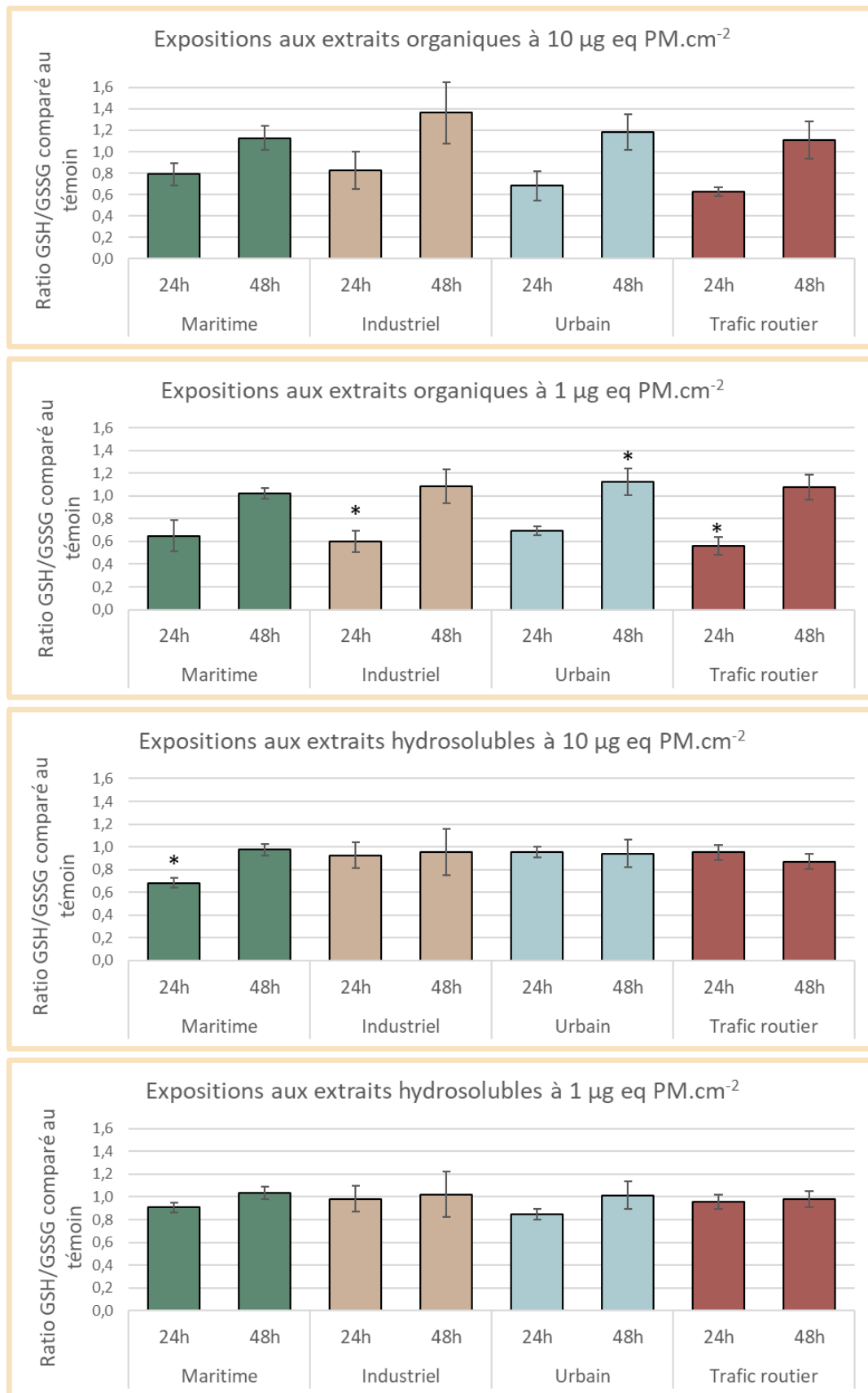


Figure 40 : Ratios GSH/GSSG comparés aux témoins sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² pendant 24 à 48 heures (n=3). (* : p < 0,05 test ANOVA suivi du test de Dunett)

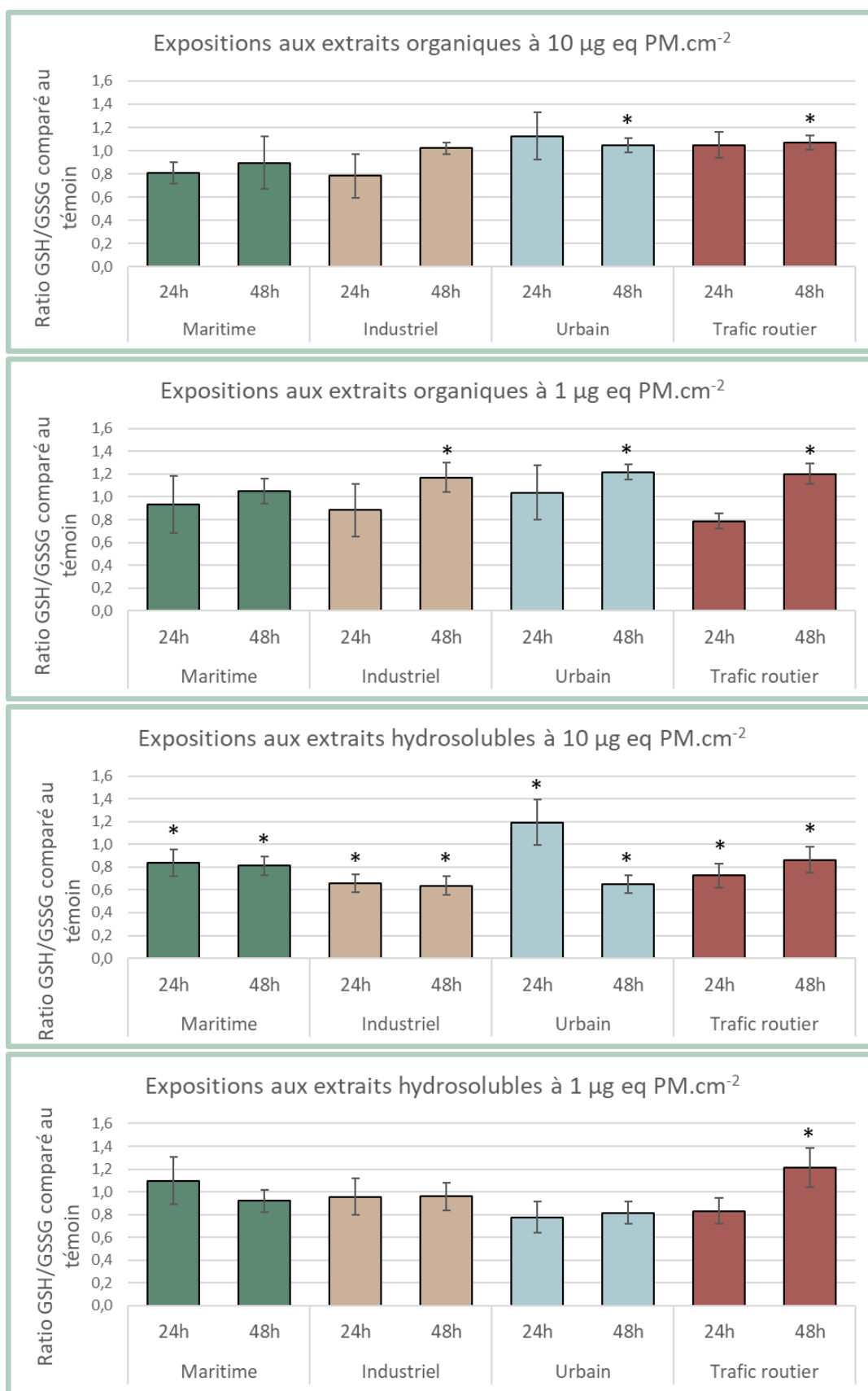


Figure 41 : Ratios GSH/GSSG comparés aux témoins sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² pendant 24 à 48 heures (n=3). (* : < 0,05 test ANOVA suivi du test de Dunett)

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Les expositions des cellules BEAS-2B (Figure 41) aux extraits organiques aux deux concentrations entraînent des augmentations significatives de certaines valeurs de GSH, avec notamment une légère augmentation des ratios. Ces augmentations significatives ont lieu à 48 heures pour les échantillons sous influence urbaine et du trafic routier pour les deux concentrations, et pour l'influence industrielle uniquement à la plus faible concentration.

Suite à l'exposition aux extraits hydrosolubles à 10 µg eq PM.cm⁻², il est possible de voir une diminution du ratio pour l'ensemble des expositions, à l'exception de l'échantillon exposé 24 heures sous l'influence urbaine. La diminution du ratio s'explique par une augmentation significative des valeurs de GSSG. Ces diminutions sont plus importantes pour les échantillons exposés selon l'influence industrielle. Lors de l'exposition à 1 µg eq PM.cm⁻² les ratios GSH/GSSG sont faiblement modifiés. Toutefois, l'influence du trafic routier augmente ce ratio, par l'augmentation significative de GSH.

L'étude de la variation du ratio GSH/GSSG a déjà été étudiée suite à l'exposition aux PM_{2.5} sur les cellules A549. Dou *et al.* (2018) ont pu observer une diminution significative de GSH et une augmentation de GSSG suite à l'exposition à des extraits organiques de PM_{2.5} issues de fumées d'huile de cuisson à 50 µg.mL⁻¹ pendant 24 heures. Kouassi *et al.* (2010) ont obtenu une augmentation du ratio GSH/GSSG suite à l'exposition pendant 24, 48 et 72 heures à des PM_{2.5} provenant d'Abidjan à des CE₁₀ (Concentration efficace 10 % ; environ 5 µg.cm⁻²) et CE₅₀ (Concentration efficace 50 % environ 30 µg.cm⁻²). Ces deux études sont contradictoires, mais les doses d'exposition utilisées ne sont pas identiques, ni les particules utilisées.

L'exposition des cellules BEAS-2B aux PM_{2.5} a tendance à augmenter la quantité totale de GSH + GSSG, ce qui pourrait être lié à l'augmentation de la biodisponibilité de GSH (Merk *et al.* 2020). Deux études montrent une augmentation du ratio GSH/GSSG de manière générale par rapport au contrôle. Ces études ont été réalisées à des temps d'expositions différents (24, 48 et 72 h, et 6 et 24 h), et sur des PM_{2.5} différentes. La première (Dergham *et al.* 2015) a étudié plusieurs origines de PM_{2.5}, l'origine urbaine étant celle qui augmentait le plus le ratio en comparaison aux influences industrielle et rurale, et la deuxième (Badran, Verdin, *et al.* 2020) a étudié les différents types d'extractions de PM_{2.5}, les PM_{2.5} non-extraites (sous forme de poudre) ont été responsables de l'augmentation la plus importante du ratio. Cette augmentation du ratio par rapport aux témoins pourrait s'expliquer par l'augmentation globale de GSH + GSSG.

3.2.2. Induction génique des enzymes antioxydantes

Les autres enzymes antioxydantes ont été étudiées par RT-qPCR afin de quantifier la modulation de leurs gènes, qui est résumée dans les tableaux suivants.

Le Tableau 30 montre la réponse antioxydante des cellules A549 exposées aux extraits organiques. Celle-ci est inhibée après 6 heures d'exposition aux différents extraits organiques. En effet, les quatre enzymes antioxydantes étudiées, NQO1, CAT, SOD1 et SOD2, ont leurs quantités relatives d'ARNm significativement diminuées. Toutefois, l'expression de la catalase n'est pas diminuée significativement pour les influences urbaine et trafic routier pour les 2 concentrations, en plus de l'influence industrielle pour la plus petite concentration. Après 24 heures d'exposition, l'inhibition semble arrêtée et le niveau basal est rétabli à l'exception du trafic routier à 24 heures à la plus grande concentration, pour lequel l'expression génique est plus élevée. L'expression génique de HMOX1 ne semble pas être modulée par les extraits organiques. Pour les expositions des cellules A549 aux extraits hydrosolubles, aucun effet significativement différent n'est observable (Tableau 31).

L'étude sur les cellules BEAS-2B montre des résultats très différents des résultats sur les cellules A549. Tout d'abord, lorsque les cellules BEAS-2B sont exposées aux extraits organiques (Tableau 32), l'expression de NQO1 est augmentée après 6 et 24 heures d'exposition pour la plus forte concentration d'extrait. NQO1 est également surexprimé à 1 µg eq PM.cm⁻² selon certaines influences, industrielle et urbaine à 6 heures, et maritime et industrielle à 24 heures. HMOX1 est également surexprimé après 6 heures d'exposition à 10 µg eq PM.cm⁻², pour toutes les influences, mais de manière plus importante pour l'extrait sous influence du trafic routier et plus faiblement pour l'influence maritime.

Quand les cellules BEAS-2B sont exposées aux extraits hydrosolubles (Tableau 33), la dose d'exposition est importante afin d'observer des résultats significativement différents. A 1 µg eq PM.cm⁻² aucune exposition n'a induit significativement l'expression génique d'une des enzymes antioxydantes. Toutefois, à 10 µg eq PM.cm⁻², NQO1 et HMOX1 sont induits après 6 et 24 heures d'exposition selon certaines influences. NQO1 est surexprimé à 6 heures par les extraits sous influence industrielle et urbaine, et à 24 heures par les extraits de toutes les influences. HMOX1 est significativement surexprimé pour toutes les influences à 6 heures, avec une induction très forte pour l'extrait industriel, et plus faible pour l'extrait maritime, et pour les extraits industriel, urbain et trafic routier à 24 heures. Un extrait hydrosoluble se démarque des autres, l'extrait hydrosoluble sous influence industrielle qui, après 6 heures d'exposition, induit significativement toutes les enzymes antioxydantes testées : NQO1, CAT, SOD1, SOD2 et HMOX1. De plus, l'exposition à l'extrait sous influence industrielle hydrosoluble induit NQO1 et HMOX1 de façon plus importante que les autres influences. L'expression génique de HMOX1 est induite d'un facteur 34 pour cet échantillon.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Tableau 30 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549 extraits organiques					
		NQO1 RQ \bar{x}	CAT RQ \bar{x}	SOD1 RQ \bar{x}	SOD2 RQ \bar{x}	HMOX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1
		Industriel	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0
		Urbain	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,0
		Trafic routier	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0
	24h	Maritime	1,7 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,0
		Industriel	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,7
		Urbain	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,1
		Trafic routier	2,7 ± 0,6	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,3	3,1 ± 1,2	1,8 ± 0,1
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
		Industriel	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
		Urbain	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0
		Trafic routier	0,5 ± 0,0	N.A.	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
	24h	Maritime	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0
		Industriel	1,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2
		Urbain	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2
		Trafic routier	0,7 ± 0,9	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,5	1,3 ± 0,0

Tableau 31 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549 extraits hydrosolubles					
		NQO1 RQ \bar{x}	CAT RQ \bar{x}	SOD1 RQ \bar{x}	SOD2 RQ \bar{x}	HMOX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,3 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2
		Industriel	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
		Urbain	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,2
		Trafic routier	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,0
	24h	Maritime	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,0
		Industriel	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,0
		Urbain	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,0
		Trafic routier	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,0
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,0
		Industriel	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,2
		Urbain	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2
		Trafic routier	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
	24h	Maritime	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,0
		Industriel	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,0
		Urbain	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1
		Trafic routier	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,0

Tableau 32 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

			BEAS-2B extraits organiques				
			NQO1 RQ \bar{x}	CAT RQ \bar{x}	SOD1 RQ \bar{x}	SOD2 RQ \bar{x}	HMOX1 RQ \bar{x}
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	3,5 ± 0,8	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,3	6,5 ± 0,5
		Industriel	3,4 ± 0,4	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	9,3 ± 0,3
		Urbain	3,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,2	9,3 ± 0,5
		Trafic routier	3,6 ± 1,4	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,3	10,9 ± 0,6
	24h	Maritime	3,5 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3
		Industriel	3,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0
		Urbain	4,4 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,3
		Trafic routier	4,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,9 ± 0,7	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3
		Industriel	2,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,1 ± 0,1
		Urbain	2,1 ± 0,6	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0
		Trafic routier	1,9 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,3
	24h	Maritime	2,3 ± 0,4	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1
		Industriel	2,5 ± 0,7	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,0
		Urbain	1,7 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0
		Trafic routier	1,9 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,0

Tableau 33 : Expression génique des enzymes du stress oxydant, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

			BEAS-2B extraits hydrosolubles				
			NQO1 RQ \bar{x}	CAT RQ \bar{x}	SOD1 RQ \bar{x}	SOD2 RQ \bar{x}	HMOX1 RQ \bar{x}
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	1,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,2	3,9 ± 0,0
		Industriel	6,9 ± 0,5	2,6 ± 0,4	2,9 ± 0,5	3,0 ± 0,6	34,8 ± 0,0
		Urbain	2,1 ± 0,9	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	9,3 ± 0,0
		Trafic routier	1,8 ± 0,7	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,2	9,2 ± 0,0
	24h	Maritime	3,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,8 ± 0,0
		Industriel	4,5 ± 0,6	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	2,3 ± 0,0
		Urbain	4,1 ± 0,9	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,2 ± 0,1
		Trafic routier	5,1 ± 0,5	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,1
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
		Industriel	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,0
		Urbain	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,0
		Trafic routier	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,0
	24h	Maritime	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2
		Industriel	2,8 ± 1,2	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,6	2,0 ± 1,0	1,7 ± 0,4
		Urbain	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,1
		Trafic routier	2,0 ± 1,3	1,3 ± 0,8	1,4 ± 0,9	1,7 ± 1,1	1,5 ± 0,7

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Différentes études ont pu observer des résultats semblables de modulation des gènes antioxydants. Pang *et al.* (2020) ont pu observer une sous-expression de NQO1 après exposition de cellules A549 pendant 24 heures à 80 mg.L⁻¹ d'extrait hydrosoluble de PM_{2.5}. Pour les cellules BEAS-2B, l'augmentation de l'expression génique de NQO1 est également documentée, notamment suite à l'exposition à 100 µg.mL⁻¹ d'extrait hydrosoluble de PM_{2.5} issues de la combustion de biomasse (Merk *et al.* 2020), et à l'exposition aux extraits organiques de PM_{2.5} à 3,75 et 15 µg.cm⁻² (Dergham *et al.* 2012). Juarez Facio *et al.* (2022) observent une légère induction de NQO1 après exposition en interface air-liquide pendant 30 minutes à des PM_{2.5}, sur une mesure à 3 et 24 heures après exposition. Ces mêmes auteurs ont pu observer que le niveau génique de CAT n'était pas modifié après ces mêmes expositions. L'étude de Merk *et al.* (2020) citée précédemment, montre également que CAT et SOD ne sont pas modulées suite à l'exposition aux PM_{2.5} issues de la combustion de biomasse.

La régulation de HMOX1, quant à elle, a été quantifiée à plusieurs reprises notamment suite à l'exposition de cellules A549 à des extraits organiques de PM_{2.5} provenant de prélèvement réalisés l'hiver ou l'été. La surexpression de HMOX1 était différente en fonction de la saisonnalité des particules, avec une inhibition génique suite à 4 heures d'exposition à 1, 10 et 20 µg.mL⁻¹ de particules hivernales, et une induction génique après 4 heures d'exposition à 1 µg.mL⁻¹ de particules estivales (Libalova *et al.* 2018). Pour d'autres auteurs, l'exposition à 10 µg.cm⁻² d'extraits hydrosolubles de PM_{2.5} entraîne une augmentation de HMOX1 sur les cellules BEAS-2B exposées 24 heures, avec des résultats identiques sur des cellules NHBE et COPD-DHBE (cellules épithéliales bronchiques provenant de malades atteints de BPCO) (Leclercq *et al.* 2018). Enfin, Gualtieri *et al.* (2012) ont démontré l'activation de HMOX1 suite à l'exposition de cellules A549 à des extraits hydrosolubles de PM_{2.5} hivernales à 10 µg.cm⁻² pendant 24 heures. Les auteurs suggèrent que cette activation pourrait être liée à une forte concentration en quinones.

4. Réponse métabolique après exposition aux PM_{2.5}

Les composés contenus dans les PM_{2.5} sont variés et la plupart des composés organiques peuvent être métabolisés par certaines protéines cytoplasmiques tels que les cytochromes P450.

4.1. Induction génique de la réponse métabolique

Les niveaux d'expression de 5 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la phase de fonctionnalisation des HAP (CYP1A1, CYP1B1, EPHX1) et d'autres xénobiotiques

(CYP3A4, CYP2B6) ont été mesurés après expositions aux extraits de PM_{2.5}. La surexpression de l'expression du CYP2B6 n'a pas pu être quantifiée pour l'ensemble des tests effectués, le nombre de C_q étant supérieur à 35. De la même manière, le nombre de C_q était supérieur à 35 pour l'expression de CYP3A4 des cellules BEAS-2B. Pour les autres échantillons, l'intégralité des gènes restant ont pu être étudiés.

Les résultats montrent de manière générale pour l'ensemble des expositions une induction génique pour CYP1A1 et CYP1B1, et pas de modulation d'expression du CYP3A4 et de EPHX1. De manière plus détaillée, les expositions aux extraits organiques sur les cellules A549 (Tableau 34) induisent une induction de CYP1A1 avec au minimum un facteur 30, et un facteur 10 pour la surexpression de CYP1B1 pour l'ensemble des influences. La surexpression de CYP1B1 est plus importante à 24 heures qu'à 6 heures d'exposition. EPHX1 a été induit uniquement pour l'échantillon du trafic routier après 24 heures d'exposition à la plus grande concentration.

L'exposition des cellules A549 aux extraits hydrosolubles (Tableau 35) entraîne des modulations géniques plus faibles que pour les expositions aux extraits organiques. Toutefois, les expositions de 6 heures aux plus fortes concentrations entraînent des inductions similaires de CYP1A1 et CYP1B1 pour les deux types d'extraits, avec une induction plus forte pour l'influence du trafic routier. De manière générale, pour les extraits hydrosolubles, le trafic routier est l'influence qui induit la réponse génique la plus forte pour CYP1A1 et CYP1B1 sur les cellules A549, de manière prédominante à 6 heures plutôt que 24 heures. Toutefois, ces deux gènes ne sont pas induits après une exposition de 24 heures à l'influence maritime à la plus faible dose, et CYP1B1 n'est pas induit significativement après 24 heures d'exposition à la plus faible dose selon l'influence industrielle.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Tableau 34 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549 extraits organiques				
		CYP1A1 RQ \bar{x}	CYP1B1 RQ \bar{x}	CYP3A4 RQ \bar{x}	EPHX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	42,8 \pm 7,8	12,5 \pm 2,1	1,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2
		Industriel	39,3 \pm 1,3	11,6 \pm 0,6	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
		Urbain	40,4 \pm 1,5	12,6 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
		Trafic routier	37,4 \pm 1,3	10,8 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0
	24h	Maritime	49,8 \pm 3,0	15,1 \pm 1,5	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1
		Industriel	46,7 \pm 14,9	13,6 \pm 3,9	0,8 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3
		Urbain	52,3 \pm 5,6	16,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,1	1,5 \pm 0,0
		Trafic routier	85,3 \pm 10,8	24,3 \pm 2,7	2,2 \pm 1,0	2,2 \pm 0,1
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	36,7 \pm 1,5	10,4 \pm 1,1	1,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
		Industriel	33,5 \pm 2,5	9,1 \pm 0,5	1,2 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0
		Urbain	28,2 \pm 5,5	7,6 \pm 1,3	1,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
		Trafic routier	32,8 \pm 1,4	8,9 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1
	24h	Maritime	35,0 \pm 2,6	11,2 \pm 1,3	0,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3
		Industriel	48,4 \pm 2,8	13,8 \pm 0,9	1,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,0
		Urbain	29,1 \pm 3,9	9,0 \pm 1,1	1,0 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3
		Trafic routier	45,3 \pm 3,0	14,8 \pm 1,2	1,9 \pm 0,1	2,1 \pm 0,4

Tableau 35 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		A549 extraits hydrosolubles				
		CYP1A1 RQ \bar{x}	CYP1B1 RQ \bar{x}	CYP3A4 RQ \bar{x}	EPHX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	23,2 \pm 3,0	12,0 \pm 2,7	1,1 \pm 0,2	1,1 \pm 0,0
		Industriel	29,9 \pm 1,8	13,9 \pm 4,8	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
		Urbain	27,2 \pm 1,7	11,2 \pm 2,0	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,0
		Trafic routier	40,6 \pm 7,6	18,2 \pm 3,8	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2
	24h	Maritime	7,1 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1
		Industriel	13,9 \pm 2,7	7,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
		Urbain	12,3 \pm 1,1	6,7 \pm 0,0	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1
		Trafic routier	23,0 \pm 0,3	11,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	3,3 \pm 0,9	2,7 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2
		Industriel	11,3 \pm 2,7	7,3 \pm 1,0	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
		Urbain	6,8 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1
		Trafic routier	17,5 \pm 0,9	7,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1
	24h	Maritime	1,8 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1
		Industriel	2,4 \pm 0,1	1,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
		Urbain	3,5 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
		Trafic routier	6,0 \pm 2,2	3,5 \pm 1,1	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3

L'exposition des cellules BEAS-2B aux extraits organiques (Tableau 36) induit une réponse forte pour l'expression de CYP1A1 avec un facteur d'induction allant au-delà de 50 pour certains échantillons. La réponse induite est plus forte après 24 heures d'exposition, les 4 influences donnent des résultats similaires. Certaines réponses sont légèrement plus fortes, notamment à 10 µg eq PM.cm⁻² pour l'influence maritime puis trafic routier, et à 1 µg eq PM.cm⁻² pour l'influence trafic routier puis maritime. Pour CYP1B1, la réponse induite est d'un facteur 10 environ par rapport au témoin, avec une réponse plus forte également à 24 heures plutôt qu'à 6 heures. Certains échantillons induisent une réponse plus importante comme les influences urbaine et trafic routier à 24 heures, exposées à 10 µg eq PM.cm⁻², et les influences maritime et industrielle à 24 heures aux plus faibles concentrations.

Les cellules BEAS-2B exposées aux extraits hydrosolubles montrent des réponses distinctes selon les concentrations d'exposition (Tableau 37). En effet, la surexpression de CYP1A1 pour les différentes influences atteint des niveaux 50 fois supérieurs comparés au témoin après 24 heures d'exposition à la plus forte concentration, alors qu'à la plus faible concentration, la surexpression génique atteint un facteur 14 au maximum pour l'influence industrielle. CYP1A1 n'est pas induit après 24 heures d'exposition à la plus faible concentration. Il est possible de remarquer une induction plus forte de CYP1B1 à 24 heures pour la plus forte concentration (facteur 3 à 6 heures, facteur 6 après 24 heures), et à la plus faible concentration, une absence d'induction à 6 heures et une augmentation de la surexpression à 24 heures, excepté pour l'influence maritime.

Une induction plus importante est présente pour l'échantillon sous influence industrielle à 6 heures pour la plus forte concentration avec une induction plus de 100 fois supérieure pour CYP1A1, 10 fois supérieure pour CYP1B1 et une induction d'EPHX1. De la même manière, CYP1A1, CYP1B1 et EPHX1 sont induits plus fortement que les autres gènes aux autres influences, après 24 heures d'exposition à la plus faible concentration sous influence industrielle.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Tableau 36 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		BEAS-2B extraits organiques			
		CYP1A1 RQ \bar{x}	CYP1B1 RQ \bar{x}	EPHX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	57,8 ± 11,4	10,0 ± 0,5	1,4 ± 0,5
		Industriel	52,2 ± 5,7	9,4 ± 0,6	1,4 ± 0,1
		Urbain	49,5 ± 4,5	10,0 ± 0,6	1,3 ± 0,2
		Trafic routier	51,8 ± 17,4	9,8 ± 5,2	1,4 ± 0,6
	24h	Maritime	62,9 ± 6,3	9,9 ± 0,9	1,2 ± 0,2
		Industriel	48,1 ± 10,0	8,9 ± 0,3	1,2 ± 0,0
		Urbain	52,3 ± 11,6	10,5 ± 1,4	1,5 ± 0,0
		Trafic routier	56,4 ± 6,0	11,8 ± 0,1	1,5 ± 0,0
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	44,2 ± 10,3	7,7 ± 2,6	1,0 ± 0,4
		Industriel	55,5 ± 1,9	9,9 ± 0,2	1,3 ± 0,0
		Urbain	37,7 ± 0,9	6,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
		Trafic routier	55,0 ± 9,0	7,5 ± 1,5	1,3 ± 0,1
	24h	Maritime	54,7 ± 17,8	13,6 ± 1,6	1,3 ± 0,2
		Industriel	61,7 ± 12,1	11,7 ± 4,5	1,2 ± 0,0
		Urbain	39,9 ± 1,5	7,9 ± 0,9	1,0 ± 0,1
		Trafic routier	55,2 ± 5,4	7,0 ± 0,9	1,0 ± 0,2

Tableau 37 : Expression génique des cytochromes et enzymes liés à la réponse métabolique, calculée selon la méthode $\Delta\Delta C_q$ (Livak et Schmittgen 2001), sur les cellules BEAS-2B exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à deux concentrations différentes, pendant 6 et 24 heures (valeurs mesurées en duplicat et sur 2 réplicats biologiques). La modulation génique significative est notée en rouge pour la surexpression (RQ>2) et en vert pour la sous-expression (RQ<0,5).

		BEAS-2B extraits hydrosolubles			
		CYP1A1 RQ \bar{x}	CYP1B1 RQ \bar{x}	EPHX1 RQ \bar{x}	
10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	27,1 ± 1,2	3,2 ± 0,3	0,9 ± 0,0
		Industriel	147,2 ± 38,7	13,8 ± 3,6	3,1 ± 0,6
		Urbain	29,9 ± 9,2	3,9 ± 1,1	1,0 ± 0,4
		Trafic routier	30,4 ± 2,0	3,3 ± 0,9	0,9 ± 0,4
	24h	Maritime	47,8 ± 4,8	6,7 ± 1,1	1,6 ± 0,0
		Industriel	53,5 ± 5,8	6,4 ± 1,5	1,5 ± 0,2
		Urbain	49,9 ± 13,6	6,6 ± 1,7	1,4 ± 0,3
		Trafic routier	62,1 ± 6,1	8,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2
1 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$	6h	Maritime	3,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,0
		Industriel	8,7 ± 1,9	1,7 ± 0,3	0,6 ± 0,2
		Urbain	6,1 ± 1,0	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1
		Trafic routier	5,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,0
	24h	Maritime	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0
		Industriel	14,0 ± 5,1	7,2 ± 3,0	2,2 ± 1,0
		Urbain	5,0 ± 1,3	3,1 ± 0,7	1,4 ± 0,6
		Trafic routier	6,6 ± 4,4	3,7 ± 2,7	1,7 ± 1,2

L'étude bibliographique permettant de comparer les données obtenues à celles existantes a permis de confirmer les résultats obtenus pour l'expression de CYP1A1 et CYP1B1. En effet, un nombre important d'études sur ces deux gènes induits par l'exposition aux PM_{2.5} sont disponibles. Plusieurs études sur les cellules BEAS-2B quantifient l'augmentation de CYP1A1, ou CYP1A1 et CYP1B1 après exposition à des extraits hydrosolubles de particules d'origines diverses, notamment issues de combustion de biomasse, des émissions diesels, des PM_{2.5} hivernales, et d'autres moins bien définies (Gualtieri *et al.* 2011 ; Merk *et al.* 2020 ; Yuan *et al.* 2019). Toutes ont vérifié l'expression génique de ces cytochromes P450, mais aussi au niveau protéique pour certaines (Yuan *et al.* 2019). D'autres études sur les cellules A549 sont disponibles, avec également une induction des deux mêmes gènes : CYP1A1 et CYP1B1. Des extraits organiques et hydrosolubles ont pu induire ces gènes, après des expositions d'au moins 24 heures (Billet *et al.* 2007 ; Gualtieri *et al.* 2012a).

Aucune étude n'a été publiée en relation avec les PM_{2.5} et la surexpression génique de CYP3A4 sur les cellules BEAS-2B ou A549. L'analyse de CYP2B6 est également peu étudiée. Une seule étude met en avant sa modulation, notamment son inhibition, après expositions répétées à 40 µg.cm⁻² de PM_{2.5} sur un nouveau modèle pulmonaire 3D (MucilAir™ : mélange de cellules primaires de l'épithélium pulmonaire, cellules ciliées, basales et caliciformes) (Despréaux *et al.* 2023). L'enzyme EPHX1 a été étudiée au moins deux fois, avec une induction de son expression génique suite à des expositions à des extraits hydrosolubles et organiques de PM_{2.5} sur des cellules A549 et BEAS-2B (Badran, Ledoux, *et al.* 2020 ; Bai *et al.* 2017).

4.2. Activité métabolique des CYP450

Afin de s'assurer de l'activation des CYP450, l'étude de l'activité de la famille CYP1 a été observée par l'utilisation d'un test mesurant l'activité enzymatique (Figure 42 et Figure 43).

L'activité des CYP1 sur les cellules A549 exposées aux différents extraits est présenté dans la Figure 42. Il est possible de voir que l'exposition aux extraits organiques à 10 µg eq PM.cm⁻² induit une augmentation de l'activité à 24 heures pour les influences industrielles, urbaines et trafic routier. Pour la concentration de 1 µg eq PM.cm⁻², l'augmentation de l'activité à lieu également à 24 heures pour les échantillons industriel et du trafic routier. Ces inductions montent à 130 % d'activité fonctionnelle des CYP1, soit 30 % supérieure au témoin. Les cellules exposées aux extraits hydrosolubles n'ont pas induit de modulation significative de l'activité des CYP1 après 24 et 48 heures d'expositions.

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Ainsi, l'activité des CYP1 est plus élevée après 24 heures d'exposition aux extraits organiques, contrairement à l'exposition aux extraits hydrosolubles qui n'induit pas de modulation de l'activité chez les cellules A549.

Lorsque les cellules BEAS-2B sont exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à 10 µg eq PM.cm⁻², l'activité des CYP1 a tendance à diminuer de manière non-significative à 24 heures. Puis à 48 heures, l'activité redevient comparable aux témoins, à l'exception de l'influence urbaine qui induit significativement l'activité des CYP1 de 80 % par rapport au témoin. À 1 µg eq PM.cm⁻², toutes les conditions d'expositions induisent significativement l'activité des CYP1 au-delà de 120 %, à l'exception de l'influence maritime à 48 heures.

Pour l'exposition aux extraits hydrosolubles (Figure 43), l'activité semble augmentée pour toutes les influences à 24 et 48 heures après exposition à 10 µg eq PM.cm⁻², mais ne le sont significativement uniquement pour l'influence industrielle et l'influence du trafic routier. Pour la concentration faible, aucune augmentation de l'activité n'est visible.

L'activité des CYP a déjà été étudiée selon la méthode EROD, qui s'explique par la conversion de l'éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente par CYP1A1. Billet *et al.* (2008) ont montré l'activité de CYP1A1 sur des cellules A549 suite à l'exposition aux PM_{2.5} à 6,3 µg.cm⁻² pendant 24, 48 et 72 heures. Cette induction a été également induite sur les cellules BEAS-2B dans deux études distinctes. Dans la première ont été exposées ces cellules à deux concentrations de PM_{2.5} (3,5 et 15 µg.cm⁻²) provenant de zones urbaines ou industrielles pendant 24, 48 et 72 heures. Ces expositions ont augmenté l'activité métabolique de CYP1A1, de manière plus importante sur les PM_{2.5} industrielles d'automne-hiver (Lepers *et al.* 2014). La deuxième a étudié l'impact des différentes fractions organiques sur l'activité des CYP, avec notamment une induction plus importante pour la fraction organique non-polaire après une exposition à 25 µg.cm⁻² pendant 48 heures (Oh *et al.* 2011).

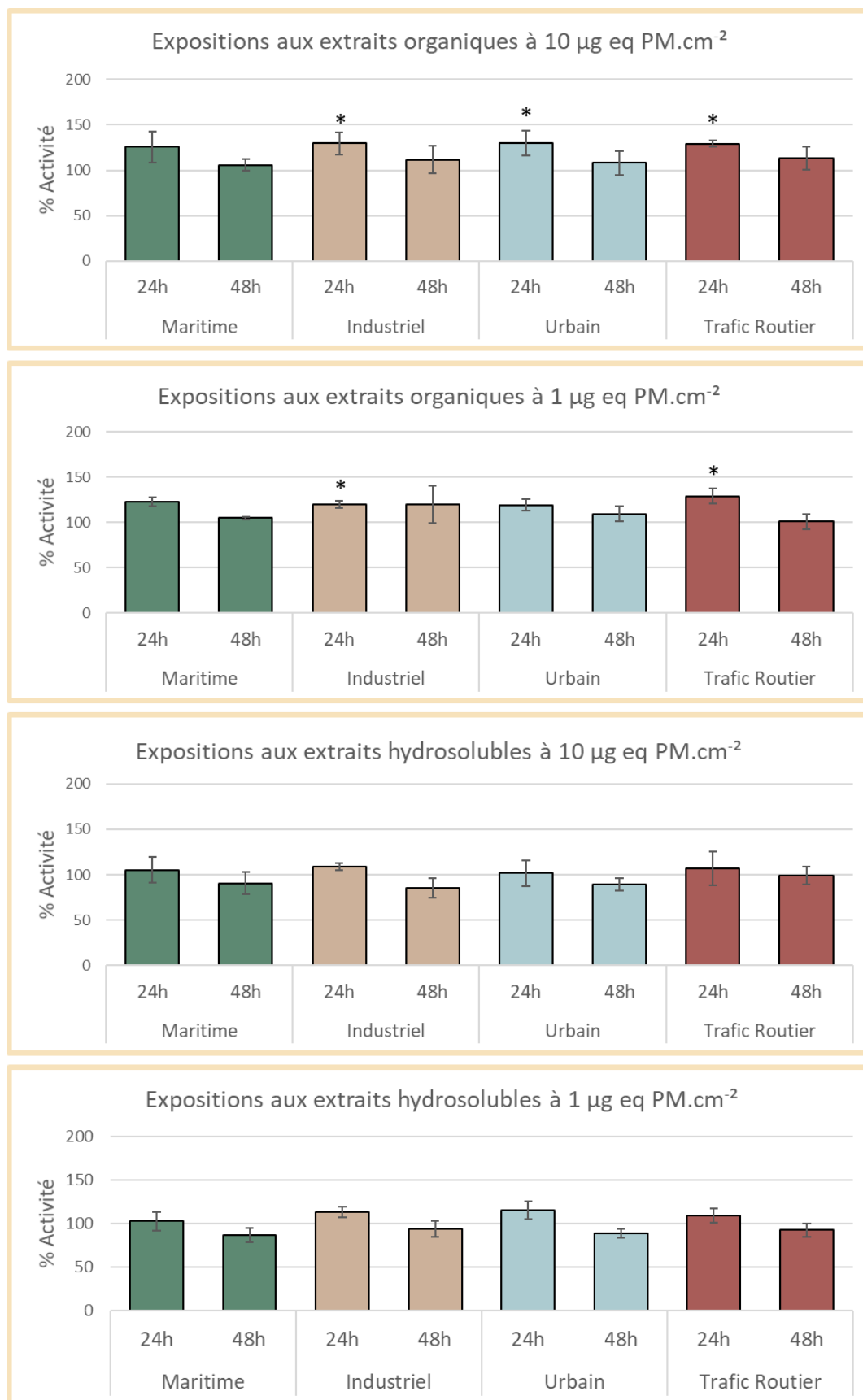


Figure 42 : Activité des CYP450 de la famille 1 dans les cellules A549 exposées pendant 24 et 48 heures aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 µg eq PM.cm⁻² (n=3). (* : p < 0,05 test ANOVA suivi du test de Dunett)

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

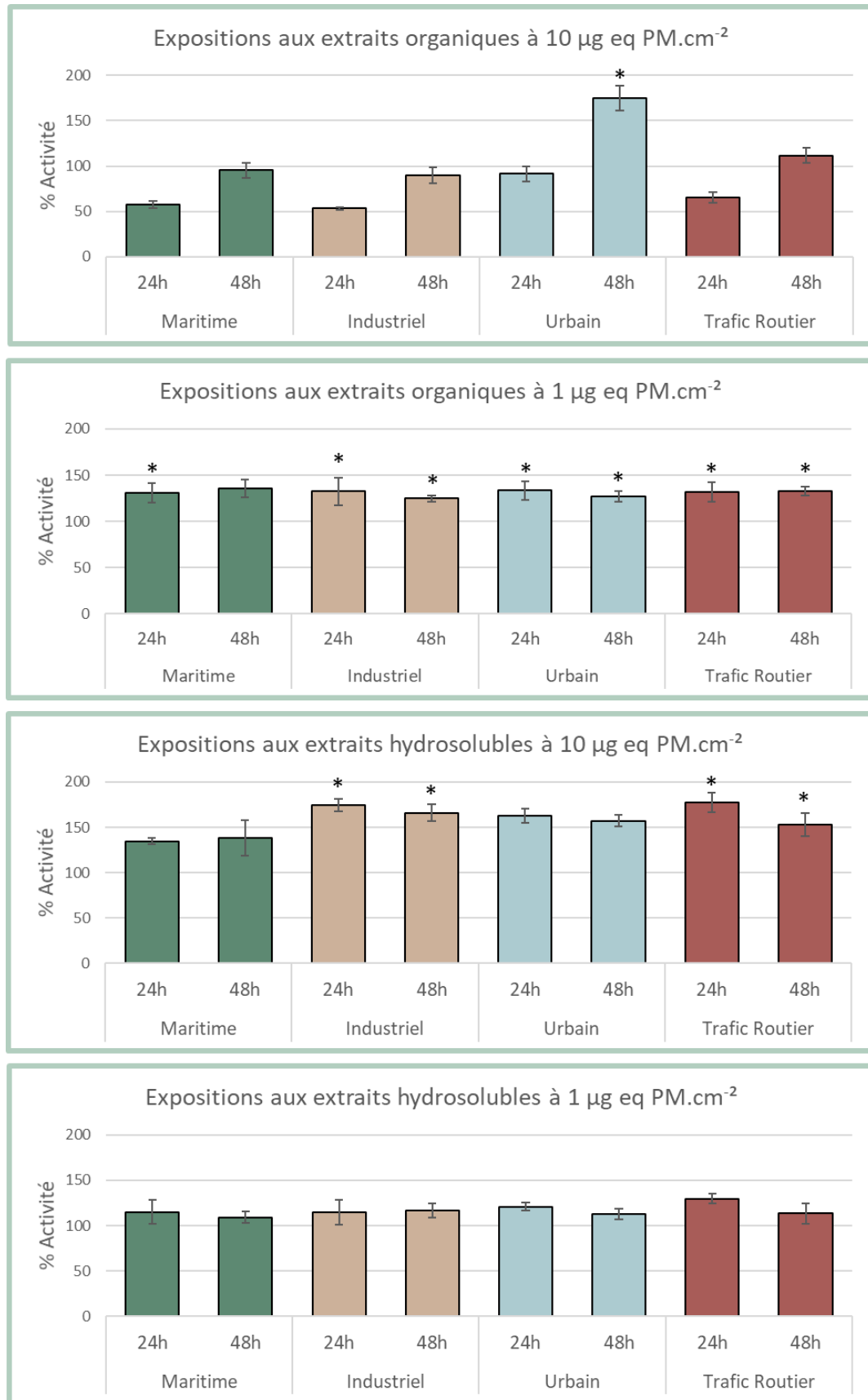


Figure 43 : Activité des CYP450 de la famille 1 dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24 et 48 heures aux extraits organiques et hydrosolubles à 1 et 10 µg.cm⁻² (n=3). (* : p<0,05 test ANOVA suivi du test de Dunett)

5. Discussion

L'étude de cytotoxicité des extraits de PM_{2.5} montre que les extraits hydrosolubles sont moins cytotoxiques que les extraits organiques, comme cela a déjà pu être observé auparavant (Chen *et al.* 2020 ; Landkocz *et al.* 2017 ; Xu *et al.* 2018). De plus, les cellules bronchiques BEAS-2B sont plus sensibles que les cellules alvéolaires A549, pour lesquelles les concentrations de CL₅₀ étaient jusqu'à 6 fois supérieures. Ces résultats sont dans la continuité des études menées précédemment (Gualtieri *et al.* 2010 ; Shang *et al.* 2019), qui observent également une sensibilité plus grande pour les cellules BEAS-2B. De plus, l'étude de cytotoxicité n'a pas montré de mortalité par rupture membranaire, même aux plus fortes concentrations, mais plutôt par diminution de la viabilité et de la prolifération cellulaire. Les PM_{2.5} ont tendance à induire des mortalités telles que l'apoptose ou l'autophagie, plutôt que la nécrose, ce qui est en accord avec la bibliographie.

Les différentes réponses de toxicités induites par les PM_{2.5} sont décrites dans le Tableau 38 et le Tableau 39.

La réponse inflammatoire suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5} a été étudiée pour quatre cytokines. TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui n'a pu être quantifiée au niveau de la sécrétion des protéines. Cependant l'étude de l'expression génique a montré une faible modulation de cette cytokine. Seules deux conditions d'expositions ont entraîné une induction de l'expression génique de TNF- α . Cette cytokine est induite précocement, et peut apparaître dès 30 minutes d'exposition, ce qui pourrait expliquer son absence suite à sa possible dégradation, lors de notre étude.

La deuxième cytokine étudiée, IL-1 β est la cytokine qui a été le plus modulée suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Cette cytokine est principalement surexprimée au niveau génique, mais les modulations géniques ne sont pas visibles au niveau de la sécrétion des cytokines. Toutefois, lorsque TNF- α est surexprimé, la surexpression d'IL-1 β est également visible. L'activation de cette cytokine serait responsable d'activation du mécanisme de la TEM (Doerner et Zuraw 2009 ; Garon *et al.* 2020), mécanisme qui a été étudié par la suite.

L'interleukine-6 a été très peu modulée suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Cependant, sa sécrétion est plutôt diminuée, notamment chez les cellules BEAS-2B après l'exposition aux extraits de PM_{2.5} issues de l'influence « industrielle ». Des études précédentes ont plutôt tendance à voir une augmentation de la sécrétion d'IL-6, ou une absence de modulation (Calcabrini *et al.* 2004 ; Manzano *et al.* 2016 ; Perrone *et al.* 2010).

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

Aucun lien spécifique avec les cytokines précédentes n'est possible, l'extrait hydrosoluble industriel est le seul à activer l'expression génique de ces trois cytokines chez les cellules BEAS-2B. Cette cytokine a un rôle pro-inflammatoire et peut activer les voies TLR et JAK/STAT3. NF- κ B peut activer la transcription d'IL-6 et ainsi activer une boucle d'activation inflammatoire (Liu *et al.* 2017). L'intérêt d'étudier IL-6 est double, d'une part pour la réponse inflammatoire, et d'autre part pour sa capacité à induire de la TEM dans différents types cellulaires (Sullivan *et al.* 2009 ; Zhao *et al.* 2014 ; Zhou *et al.* 2015).

La dernière cytokine, IFN- γ n'a pas pu être quantifiée suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Ce résultat pouvait être attendu étant donné que cette cytokine est produite majoritairement par les lymphocytes T et les *Natural killer* (Burke et Young 2019). Toutefois cette cytokine est présente au niveau pulmonaire (Fagerberg *et al.* 2014), et a déjà été observée dans des cellules épithéliales suite à l'exposition aux PM_{2.5} (Abbas *et al.* 2019). Les cellules immunitaires vont avoir pour rôle la libération de cette cytokine pro-inflammatoire afin d'induire la sécrétion de TNF- α et d'autres interleukines. Cette cytokine jouerait un rôle dans l'induction de la TEM (Imai *et al.* 2019), mécanisme que l'on souhaite étudier par la suite. Il aurait été intéressant de rechercher si cette cytokine peut activer un tel mécanisme suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Cette cytokine semble avoir un deuxième rôle dans la TEM, et serait capable d'être inhibée afin de créer des tumeurs non-détectables par le système immunitaire (Tseng *et al.* 2022).

La réponse inflammatoire induite par les extraits de PM_{2.5} est relativement faible. Cette réponse est liée à la composition chimique et biologique de nos particules. Les extraits contiennent très peu d'endotoxines, et ne sont possiblement pas suffisamment présentes pour induire des effets inflammatoires (Schins *et al.* 2004 ; Steenhof *et al.* 2011). D'autres composés tels que certains métaux, notamment Fe, V, Ni et Cu, ainsi que certains HAP et les quinones peuvent induire des réponses inflammatoires (Baeza-Squiban *et al.* 1999). Ces molécules présentes dans nos échantillons de PM_{2.5} pourraient être responsables des réponses inflammatoires que l'on observe. En effet, les extraits hydrosolubles sous influence industrielle ont tendance à induire TNF- α , IL-1 β et IL-6 au niveau génique et protéique. Les extraits organiques induisent moins de réponse inflammatoire, mais une influence se distingue des autres, l'influence du trafic routier, qui est capable d'induire IL-1 β et IL-6.

La réponse au stress oxydant a, dans un premier temps, été évaluée par des tests de potentiel oxydant. Deux méthodes ont été utilisées, et ces méthodes ne sont pas sensibles aux mêmes composés chimiques. La méthode utilisant l'acide ascorbique a été corrélée avec les métaux et les HAP, alors que la méthode au dithiothréitol est plutôt corrélée avec les

métaux (Fadel 2021 ; Janssen *et al.* 2014 ; Moufarrej *et al.* 2020). La composition chimique des PM_{2.5} joue un rôle important sur leur potentiel oxydant. Ainsi, les résultats de notre étude montrent que l'extrait hydrosoluble sous influence urbaine possède les plus grandes valeurs de potentiel oxydant pour le test OP-AA. Pour le test OP-DTT, les extraits de PM_{2.5} ont des valeurs de potentiel oxydant plus faibles, et les influences industrielle et urbaine sous forme d'extraits hydrosolubles induisent les plus grandes valeurs de potentiel oxydant. Les extraits hydrosolubles sont potentiellement plus oxydants que les extraits organiques. En effet, ces premiers peuvent contenir notamment des métaux et des composés organiques hydrosolubles telles que les quinones.

Dans un deuxième temps, la réponse au stress oxydant a été étudiée sur les cellules bronchiques et alvéolaires. Le ratio de glutathion réduit sur oxydé a été étudié car c'est un marqueur du stress oxydant. En effet, une diminution de ce ratio est synonyme de l'induction d'une réponse antioxydante (Owen et Butterfield 2010). Lorsque le ratio augmente, cela peut se traduire par l'activation de la réaction enzymatique de la glutathion réductase, qui transforme GSSG en GSH, soit l'activation de la réponse antioxydante. Les réponses des cellules A549 exposées sont modulées uniquement pour les extraits organiques. Ces expositions entraînent une diminution à 24 heures, puis une augmentation à 48 heures du ratio. Il y aurait une augmentation du stress oxydant d'abord, suivie d'une réponse antioxydante. Des résultats similaires ont déjà pu être observés dans des études précédentes (Badran, Verdin, *et al.* 2020 ; Dergham *et al.* 2012).

Chez les cellules BEAS-2B, la réponse antioxydante suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5} est plus variable. Les extraits hydrosolubles semblent diminuer le ratio, soit induire du stress oxydant de manière plus prononcée. Deux études ont observé des phénomènes de diminution du ratio suite à l'exposition aux PM_{2.5} sous forme d'extraits solubles (Zhai *et al.* 2022), et cette diminution pourrait être liée à la présence de Fe, qui induit la ferroptose (Guo *et al.* 2022).

Les réponses cellulaires ne sont pas identiques pour les deux modèles, selon les extraits de PM_{2.5}, organiques ou hydrosolubles. Toutefois, les extraits hydrosolubles induisent un stress oxydant plus importante pour les cellules BEAS-2B, ce qui corrèle avec le potentiel oxydant. De plus, l'échantillon « hydrosoluble urbain » pourrait être plus inducteur de stress oxydant, en accord avec les résultats de OP-AA et l'augmentation puis une diminution du ratio GSH/GSSG, ce qui pourrait être assimilé à un stress oxydant et une réponse antioxydante possiblement plus précoce.

L'évaluation génique des enzymes antioxydantes a montré des résultats très différents en fonction des types cellulaires. Les cellules alvéolaires A549 n'ont pas réagi suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5} par l'induction d'expression génique antioxydante. En effet,

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

les extraits organiques inhibent la plupart des enzymes antioxydantes (NQO1, CAT, SOD1 et SOD2), HMOX1 n'est pas modulé. Aucun extrait hydrosoluble n'a modulé l'expression génique des enzymes antioxydantes, de la même façon que lors de la réponse à GSH/GSSG. HMOX1 pourrait ne pas être induit suite à l'absence de composés oxydants contenant des hèmes dans les échantillons organiques. De plus, HMOX1 est connu pour être induit par la voie Nrf2 (Sánchez-Ortega *et al.* 2021), la voie Nrf2 n'a donc pas été activée chez les cellules A549. Pourtant, la modulation de cette voie a déjà été observée auparavant chez ces mêmes cellules suite à l'exposition aux PM_{2.5} (Gualtieri *et al.* 2012b).

Au contraire, la réponse génique d'enzymes antioxydantes des cellules BEAS-2B suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5} est différente. En effet, chacune des influences a été capable d'induire les enzymes NQO1 et HMOX1, indiquant l'activation de la voie Nrf2 pour ces cellules. Ces résultats d'induction de NQO1 peuvent laisser penser que des composés organiques hydrosolubles tel que des quinones pourraient être présents dans les échantillons hydrosolubles et organiques. Toutefois, aucune activation de la catalase et ses superoxydes dismutases n'a été observées sur ce type cellulaire, à l'exception de l'extrait hydrosoluble issu de l'influence industrielle. Ce site semble induire une réponse antioxydante beaucoup plus importante que les autres influences, autant dans le nombre d'enzymes surexprimées, que dans l'intensité de ces surexpressions.

La fraction hydrosoluble sous influence industrielle induit une forte réponse antioxydante, ce qui pourrait être corrélé avec le résultat OP-DTT hydrosoluble, qui montrait un potentiel oxydant important pour ce site, mais également avec le ratio GSH/GSSG qui est plus fortement diminué pour ce site. Ainsi, l'extrait hydrosoluble sous influence industrielle se démarque des autres extraits par ses capacités à induire un stress oxydant et une réponse antioxydante.

Les extraits organiques et hydrosolubles des influences « trafic routier » et « urbaine » induisent également des réactions antioxydantes notables, mais dans une moindre mesure par rapport à l'échantillon « influence industriel hydrosoluble ».

La capacité de métabolisation des composés organiques a été évaluée par l'étude d'enzymes de phase I, notamment des CYP450 et de EPHX1. Notre étude a montré une surexpression génique de CYP1A1 et CYP1B1 principalement. CYP1A1 a été induit majoritairement par rapport à CYP1B1, et la fraction organique était capable d'induire ces gènes de manière plus forte que les extraits hydrosolubles. De manière générale, les cellules BEAS-2B ont surexprimé ces gènes plus fortement que les cellules A549. Pour les A549, l'extrait organique sous influence trafic routier s'est démarqué des autres, pour avoir surexprimé 85 fois CYP1A1, 24 fois CYP1B1, et est le seul à surexprimer EPHX1 2 fois, par

rapport aux cellules non exposées. Pour les cellules BEAS-2B, l'extrait hydrosoluble sous influence industrielle a induit une expression génique 100 fois supérieure pour CYP1A1, et 10 fois supérieure pour CYP1B1 par rapport aux autres influences. De plus, cet extrait a également induit l'expression de EPHX1.

La surexpression génique de ces enzymes de métabolisation ne reflète pas l'activité métabolique dont elles sont capables. C'est pourquoi l'étude de l'activité des cytochromes P450 de la famille 1 (CYP1) a été effectuée.

Les cellules A549 ont augmenté significativement leur activité métabolique suite à l'exposition aux extraits organiques uniquement. Les cellules BEAS-2B n'ont pas répondu de la même manière. En effet, à forte concentration d'extrait organique, seul l'extrait urbain a augmenté l'activité métabolique des CYP1 à 48 heures. En effet, pour les autres extraits il est possible d'observer une diminution de l'activité métabolique à 24 heures, puis un retour au niveau basal de l'activité des CYP. Il est possible que la présence importante de composés organiques à métaboliser à 10 µg eq PM.cm⁻², ait induit l'absence de cofacteurs nécessaires à l'activation enzymatique des CYP (NADH, NADPH), ce qui aurait pu limiter leur activité. Une étude met en avant que l'activité des CYP450 non-hépatiques pourrait être réduite suite à la diminution de disponibilité de l'hème, ainsi limitant l'incorporation de CYP450 dans le réticulum endoplasmique, ce qui va nuire à l'activité de métabolisation de cette enzyme (Meyer *et al.* 2002).

Toutefois, il est possible d'observer que la plupart des extraits organiques et hydrosolubles sont capables d'induire l'augmentation de l'activité métabolique des CYP1 pour les cellules BEAS-2B.

Il est possible de voir que l'échantillon hydrosoluble sous influence industrielle se démarque à nouveau par la surexpression génique forte et l'augmentation de l'activité métabolique des CYP450 sur les cellules BEAS-2B. Les autres influences sont capables d'induire ces enzymes également, notamment les influences trafic routier et urbaine. L'influence maritime peut induire l'expression génique des CYP1A1 et CYP1B1, mais l'activité induite par les extraits de PM_{2.5} de ce site est inférieure en comparaison aux autres influences.

L'activation de ces enzymes de métabolisation traduit l'activation des voies de signalisation AhR-XRE. Les composés organiques sont connus pour induire cette voie, notamment le BaP qui est souvent utilisé comme substance de référence pour l'activation des CYP1A1 et CYP1B1 (Chang *et al.* 2006 ; Meili Gao *et al.* 2020). D'autres composés des PM_{2.5} comme les métaux, particulièrement As, Hg, Pb, Cd, Cr, Cu et V, seraient capable d'inhiber la réponse de CYP1A1, notamment par différentes voies telles que HMOX1, Nrf2, NF-κB, AP-1, AhR ou par la liaison directe au CYP (Anwar-Mohamed *et al.* 2009).

Les extraits de PM_{2.5} n'ont pas induit le CYP3A4, ce qui pouvait être attendu étant donné la proportion très faible de perturbateurs endocriniens dans les PM_{2.5} (Salgueiro-

Chapitre 4

Étude des mécanismes de réponses induits par les PM_{2.5}

González *et al.* 2013, 2015). En effet, les perturbateurs endocriniens peuvent être issus des composés plastiques comme les phtalates et le bisphénol A. La concentration maximale de somme des phtalates dans nos échantillons est de 6,8 ng.m⁻³ pour l'échantillon trafic routier, ce qui est très éloignée des concentrations maximales qui ont déjà pu être observées en extérieur : 45 ng.m⁻³ pour DEHP et 55 ng.m⁻³ pour DBP. D'autres composés sont capables d'induire CYP3A4, notamment les pesticides tels que le chlordécone, le DDT, ou le lindane, les PCB 118 et 153, et le bisphénol A (Hernandez *et al.* 2009), qui ont été retrouvé dans les PM_{2.5} en Chine (Sun *et al.* 2020 ; Xu *et al.* 2005).

Les échantillons de PM_{2.5} montrent des réponses de cytotoxicité distinctes et des inductions de mécanismes de réponse différentes. Toutefois, certains effets sont très intéressants à noter, notamment pour l'extrait hydrosoluble sous influence industrielle qui a activé la réponse inflammatoire la plus importante par l'induction de TNF- α , IL-1 β et IL-6. Cet échantillon a entraîné la réponse antioxydante la plus forte, d'une part par la diminution du ratio GSH/GSSG, d'autre part par l'augmentation très forte de NQO1 et HMOX1. Il a été le seul à induire la surexpression génique des autres enzymes antioxydantes CAT, SOD1 et SOD2. Enfin, il a pu activer les gènes de CYP1A1, CYP1B1 et EPHX1 de manière plus importante que tous les autres échantillons. Les voies AhR et Nrf2 ont bien été activées suite à l'exposition à cet extrait. Cet extrait hydrosoluble de PM_{2.5} sous influence industrielle est l'échantillon qui a les capacités inflammatoires, oxydantes et de métabolisation les plus fortes. Le modèle cellulaire BEAS-2B a été plus sensible à cet échantillon que le modèle A549, et les effets ont été observés principalement à 10 μ g eq PM.cm⁻².

Une autre influence doit être mise en avant, celle du trafic routier. En effet, les extraits de cette influence ont induit des réponses inflammatoires, antioxydantes et de métabolisation sur les deux types cellulaires et aux deux concentrations.

L'influence maritime active moins les mécanismes de défense que les autres influences de PM_{2.5} extraites. En effet, la réponse inflammatoire est quasiment absente suite à l'exposition à l'extrait sous influence maritime, la réponse antioxydante était la moins prononcée des quatre influences. Par contre la réponse métabolique était similaire à celle des extraits d'autres influences. Ces réponses montrent que cet échantillon, qui induisait la CL₅₀ la plus basse, induit des effets toxiques qui ne sont pas liées aux stress oxydants.

La plupart des mécanismes étudiés ici sont également capables d'induire la TEM, avec notamment la réponse inflammatoire par IFN- γ , TNF- α et IL-1 β , mais aussi certaines voies comme Nrf2 et AhR. Toutefois, il faut dans un premier temps vérifier si le mécanisme de TEM est induit suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}.

Chapitre 5 :

Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la transition épithélio-mésenchymateuse

Chapitre 5 : Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la transition épithélio-mésenchymateuse

Grâce à l'étude de cytotoxicité sur les cellules A549 et BEAS-2B, les concentrations de CL₁₀ ont été déterminées et ont été utilisées pour l'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse. La TEM a été étudiée sur un seul modèle cellulaire, le modèle A549, qui est particulièrement connu pour avoir des caractéristiques épithéliales et pour sa capacité à pouvoir réaliser le mécanisme de TEM. En effet, ce modèle est suffisamment modulable pour obtenir un phénotype mésenchymateux. Au contraire, le modèle BEAS-2B utilisé précédemment possède des caractéristiques mésenchymateuses de manière constitutive, et sont donc moins modulables pour effectuer cette transition. Pour cela, deux paramètres ont été étudiés sur les cellules A549 : l'étude de la morphologie cellulaire dans un premier temps, puis l'étude des biomarqueurs de la TEM.

1. Étude morphologique des cellules exposées aux extraits de PM_{2.5}

L'étude de la morphologie des cellules a été effectuée suite à une exposition aux extraits de PM_{2.5} pendant 7 jours consécutifs. Deux témoins ont été effectués en parallèle afin d'étudier les changements morphologiques qui peuvent être mis en place lors de la TEM : un témoin non-exposé afin d'étudier la morphologie naturelle des cellules (morphologie épithéliales) et un témoin positif, avec des cellules exposées au TGF- β à 10 ng.mL⁻¹ (morphologie mésenchymateuse). Ainsi, il est possible d'observer que les cellules témoin ont une forme cubique et forment un épithélium jointif (Figure 44 a.). Il n'y a pas de rupture dans l'épithélium formé, et les cellules couvrent entièrement la lame. Lorsque les A549 sont exposées pendant 7 jours au témoin positif (Figure 44 b.), la morphologie des cellules change. Une partie des cellules possède toujours une forme cubique et jointive, similaire aux cellules du témoin négatif. Toutefois, d'autres cellules possèdent une forme « d'épingle », les cellules sont allongées et possèdent une polarisation de type avant/arrière. Il est également possible de voir la dégradation de l'intégrité de la barrière épithéliale. Les cellules ont alors une morphologie plutôt fibroblastique, associé à un phénotype mésenchymateux.

Lorsque les cellules sont exposées aux extraits de PM_{2.5}, et notamment à l'extrait sous influence trafic routier, des changements phénotypiques sont observables. Pour l'exposition à l'extrait organique à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$ (Figure 44 c.), la morphologie cellulaire semble se distinguer en deux typologies. Une partie des cellules possède toujours sa forme épithéliale initiale, c'est-à-dire que les cellules forment une barrière jointive, avec une morphologie cubique. D'autres cellules ont une morphologie allongée similaire aux cellules du témoin positif. Néanmoins, les cellules paraissent moins longues après l'exposition à l'extrait

Chapitre 5

Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la TEM

organique qu'après exposition au témoin positif. Il y a tout de même eu un changement morphologique des cellules exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} sous l'influence du trafic routier, d'un phénotype épithélial vers mésenchymateux.

Pour l'exposition à l'extrait hydrosoluble à 10 µg eq PM.cm⁻² (Figure 44 d.), la réponse morphologie des cellules est similaire à celle de l'exposition aux extraits organiques. Il est possible d'observer des changements morphologiques analogues, avec des cellules cubiques formant un épithélium accompagnées de cellules de forme fibroblastique.

Selon l'étude morphologique, l'exposition aux extraits organiques et hydrosolubles de PM_{2.5} issues du trafic routier entraînent un changement morphologique. Les cellules A549 possèdent des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses après ces expositions. L'intégralité des cellules ne se sont pas transformées, mais une partie a bien suivi un changement de morphologie.

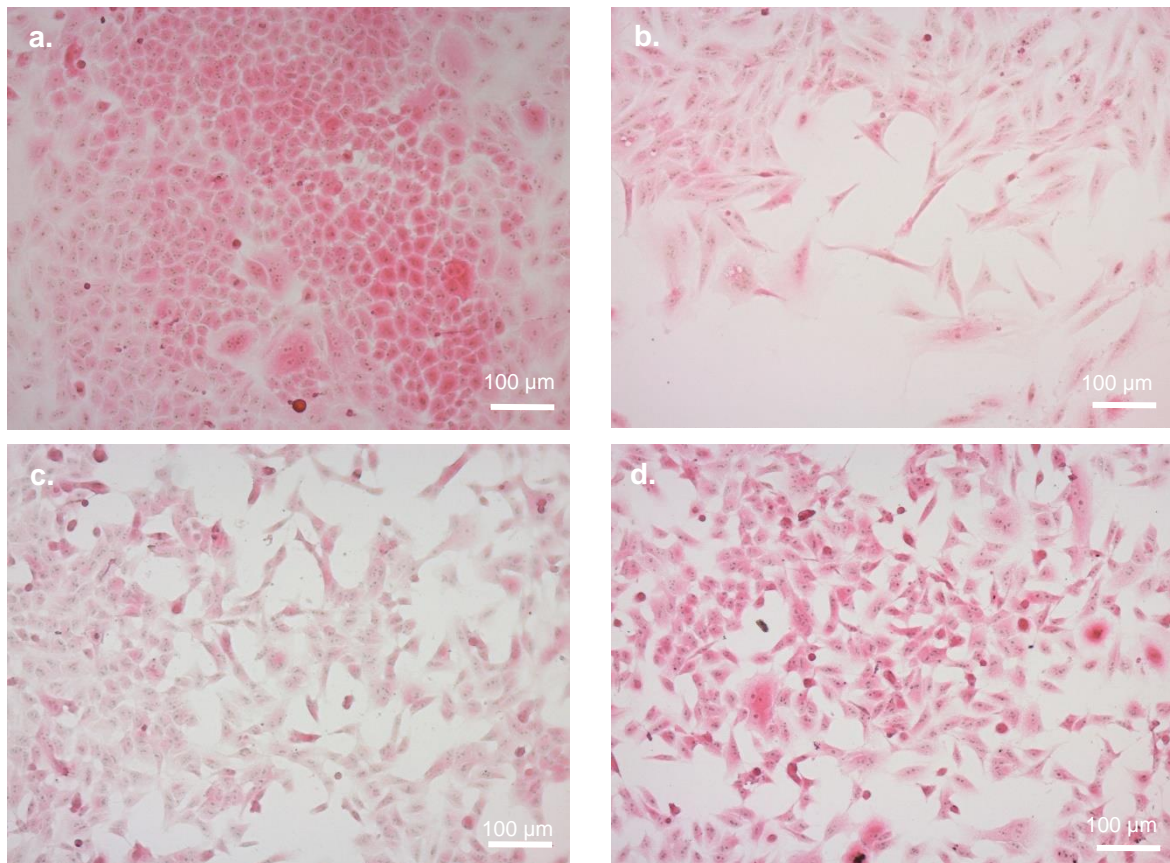


Figure 44 : Étude morphologique des cellules A549 exposées pendant 7 jours, fixées et colorées selon la méthode hématoxyline éosine. a. A549 non-exposées. b. A549 exposées au témoin positif TGF-β à 10 ng.mL⁻¹. c. A549 exposées à l'extrait organique sous influence trafic routier à 10 µg eq PM.cm⁻². d. A549 exposées à l'extrait hydrosoluble sous influence trafic routier à 10 µg eq PM.cm⁻².

2. Étude des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux

Afin de s'assurer de la présence du mécanisme de TEM, il est nécessaire de vérifier la diminution voire la disparition des marqueurs épithéliaux et l'apparition des marqueurs mésenchymateux.

2.1. Quantification des protéines

L'étude de ces marqueurs a été effectuée par western blot. Cette méthode a permis de quantifier les protéines codant pour deux marqueurs épithéliaux et deux marqueurs mésenchymateux. Le premier marqueur épithélial est la E-cadhérine, une molécule d'adhérence intercellulaire au niveau des jonctions adhérentes. Le deuxième marqueur épithélial est ZO-1 (zona occludens 1), lui aussi une molécule d'adhérence intercellulaire, mais localisée dans les jonctions serrées, sur le pôle apical de la cellule épithéliale. Ensuite, le premier marqueur mésenchymateux est la N-cadhérine. Cette protéine possède la même fonction que la E-cadhérine mais est spécifiquement présente sur les cellules mésenchymateuses. Enfin, la vimentine, le dernier marqueur mésenchymateux, est une protéine du cytosquelette, plus précisément un filament intermédiaire qui offre une dynamique importante aux cellules mésenchymateuses.

Ainsi, les cellules A549 ont été exposées au témoin positif (TGF- β) ou aux différents extraits de PM_{2.5}, aux deux concentrations 1 et 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$, pendant 3 à 7 jours. Les résultats concernant les expositions aux extraits organiques et hydrosolubles pendant 3 et 7 jours sont décrits dans les Tableau 40, Tableau 41, Tableau 42 et Tableau 43.

Les premières observations montrent l'absence de ZO-1 pour les cellules exposées pendant 3 jours. En effet, les cellules A549 n'expriment pas suffisamment la protéine ZO-1 pour l'étude de la quantification par western blot après 1 jour de mise en culture et 3 jours d'exposition, y compris pour les cellules témoins.

L'exposition de 3 jours aux extraits organiques entraîne très peu de modifications au niveau des quantités de protéines épithéliales et mésenchymateuses (Tableau 40). La quantité de E-cadhérine est diminuée suite à l'exposition aux extraits sous influences maritime et industrielle. L'exposition à l'influence du trafic routier a tendance à entraîner une augmentation de la quantité d'E-cadhérine. Les niveaux de la N-cadhérine et de la vimentine ne sont pas modifiées suite à l'exposition aux extraits organiques de PM_{2.5}. Toutefois, la vimentine a été augmentée suite à l'exposition à l'extrait de PM_{2.5} sous influence maritime à 10 $\mu\text{g eq PM.cm}^{-2}$. Après 3 jours d'exposition aux extraits organiques, le marqueur épithélial commence à disparaître, mais les marqueurs mésenchymateux ne sont pas encore totalement mis en place.

Chapitre 5

Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la TEM

Lorsque les cellules A549 sont exposées 7 jours à ces mêmes extraits organiques (Tableau 41, Figure 45), les réponses induites sont plus marquées qu'après 3 jours d'exposition. Tout d'abord, le marqueur épithélial ZO-1 est présent chez les cellules non-exposées, et une forte diminution de la quantité ce marqueur est visible suite à l'exposition aux extraits sous influences maritime et trafic routier à forte concentration, et industrielle à faible concentration. La quantité de E-cadhérine est également diminuée, dans des quantités moins importantes que ZO-1, à l'exception de l'influence maritime. Pour les marqueurs mésenchymateux, certaines influences entraînent une augmentation de la quantité de N-cadhérine, notamment pour les influences urbaine et trafic routier, et de vimentine pour les influences urbaine dans une moindre mesure, et industrielle et trafic routier plus largement. Ainsi, il est possible d'observer une diminution de la quantité des marqueurs épithéliaux et une augmentation de la quantité des marqueurs mésenchymateux pour les sites sous influences industrielle et urbaine, et de manière très marquée pour le site sous influence trafic routier. L'extrait des PM_{2.5} collectées sur le site sous influence maritime ne semble pas induire ce changement de marqueurs de TEM. La concentration de l'extrait est importante, et les effets sont plus importants à 10 µg eq PM.cm⁻².

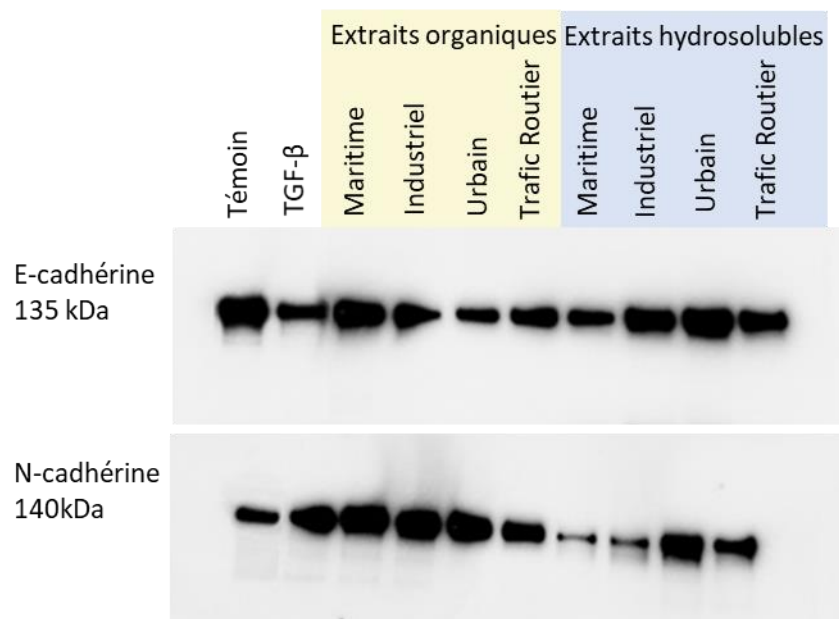


Figure 45 : Western blot des cellules A549 exposées 7 jours aux extraits à 10 µg eq PM.cm⁻² selon les différentes influences, avec révélation des protéines E-cadhérine et N-cadhérine.

Tableau 40 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à 1 et 10 µg PM eq.cm⁻² pendant 3 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.

Influences	Maritime		Industrielle		Urbaine		Trafic routier	
	1	10	1	10	1	10	1	10
Concentrations en µg eq PM.cm ⁻²	1	10	1	10	1	10	1	10
E-cadhérine	-	-	-	-	=	=	+	=
N-cadhérine	=	=	=	=	=	=	=	=
Vimentine	=	+	=	=	=	=	=	=

Tableau 41 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits organiques de PM_{2.5} à 1 et 10 µg PM eq.cm⁻² pendant 7 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.

Influences	Maritime		Industrielle		Urbaine		Trafic routier	
	1	10	1	10	1	10	1	10
Concentrations en µg eq PM.cm ⁻²	1	10	1	10	1	10	1	10
ZO-1	-	--	--	=	-	-	-	--
E-cadhérine	=	=	-	-	-	-	-	-
N-cadhérine	=	=	=	=	=	+	+	++
Vimentine	=	=	+	++	=	+	=	++

L'exposition des cellules A549 aux extraits hydrosolubles pendant 3 jours entraîne peu de diminution du marqueur épithélial E-cadhérine (Tableau 42). Cet effet à lieu uniquement pour l'influence maritime à 10 µg eq PM.cm⁻². Par contre, la quantité du marqueur mésenchymateux N-cadhérine est augmentée pour la plupart des extraits hydrosolubles testés. La quantité de vimentine est également augmentée pour certaines influences spécifiques comme l'influence industrielle et du trafic routier. Les effets sont différents pour les extraits hydrosolubles par rapport aux extraits organiques, avec une diminution moins présente de la quantité des marqueurs épithéliaux sur les différentes influences testées, mais une augmentation de la quantité des marqueurs mésenchymateux plus importante sur l'ensemble des influences testées.

Après 7 jours d'exposition aux extraits hydrosolubles (Tableau 43, Figure 45), les quantités du marqueur épithélial ZO-1 sont diminuées pour l'ensemble des extraits testés à 10 µg eq PM.cm⁻². La quantité de E-cadhérine est significativement moins présente sur les cellules exposées aux extraits urbain et du trafic routier, mais est fortement augmentée sur les cellules exposées à l'extrait sous influence industrielle. La quantité du marqueur mésenchymateux N-cadhérine est augmentée suite aux expositions à 1 µg eq PM.cm⁻² uniquement, et non à 10 µg eq PM.cm⁻² pour l'ensemble des influences. Toutefois, l'exposition à l'influence du trafic routier montre une augmentation de manière importante la quantité de ce marqueur à 10 µg eq PM.cm⁻². La quantité de vimentine suit cette tendance à

Chapitre 5

Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la TEM

1 µg eq PM.cm⁻² pour les influences maritime et industrielle. Cependant sa quantité n'est pas augmentée pour les cellules exposées à l'influence urbaine. Les cellules exposées à l'influence du trafic routier voient leurs quantités de marqueurs mésenchymateux augmentées à nouveau avec la vimentine.

Tableau 42 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à 1 et 10 µg PM eq.cm⁻² pendant 3 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.

Influences	Maritime		Industrielle		Urbaine		Trafic routier	
	1	10	1	10	1	10	1	10
Concentrations en µg eq PM.cm ⁻²	1	10	1	10	1	10	1	10
E-cadhérine	=	-	=	=	=	=	=	=
N-cadhérine	+	=	+	+	+	+	=	+
Vimentine	=	=	+	+	=	=	=	+

Tableau 43 : Quantification des protéines par western blot des cellules A549 exposées aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à 1 et 10 µg PM eq.cm⁻² pendant 7 jours, n=2. Les résultats sont exprimés par rapport au témoin, avec les symboles suivant pour montrer les différences significatives : = : inchangée, + : >2, ++ : >4, - : <-2, -- : <-4.

Influences	Maritime		Industrielle		Urbaine		Trafic routier	
	1	10	1	10	1	10	1	10
Concentrations en µg eq PM.cm ⁻²	1	10	1	10	1	10	1	10
ZO-1	=	-	=	-	--	--	=	--
E-cadhérine	=	=	=	++	=	-	-	-
N-cadhérine	+	=	+	=	+	=	+	++
Vimentine	++	+	++	+	=	=	+	++

Ces expositions de 7 jours aux extraits hydrosolubles de PM_{2.5} ont induit une diminution des marqueurs épithéliaux, et une augmentation des marqueurs mésenchymateux pour un nombre plus important d'échantillon. En effet, l'influence maritime montre une augmentation des marqueurs mésenchymateux non retrouvée lors des expositions aux extraits organiques. La fraction hydrosoluble des PM_{2.5} collectées sous l'influence urbaine semble ne pas induire la TEM, mais les caractéristiques épithéliales de la cellule ne sont plus identiques aux cellules témoins. L'influence du trafic routier a entraîné une forte diminution du caractère épithélial des cellules, et une forte augmentation de leur caractère mésenchymateux. Cette influence semble induire le plus la TEM, de la même manière pour les différents extraits.

3. Discussion

L'étude de la TEM a montré des différences selon les durées d'exposition et l'origine des PM_{2.5}. En effet, l'exposition pendant 3 jours n'a induit que faiblement les changements des marqueurs de TEM comparé à l'exposition sur 7 jours. D'une part, la quantité de E-cadhérine a faiblement diminué, pour les extraits notamment sous influences maritime et industrielle. La quantité des marqueurs mésenchymateux a augmenté pour la plupart des extraits hydrosolubles sous influences, alors que pour les extraits organiques, on ne retrouve pas cette augmentation.

L'exposition à 7 jours a, quant à elle, montré l'inversion des marqueurs épithéliaux vers mésenchymateux de manière plus prononcée pour l'ensemble des influences et pour les deux extraits avec une réponse plus marquée pour les extraits organiques des PM_{2.5} sous influences maritime et industrielle, et pour les extraits hydrosolubles des PM_{2.5} sous influences urbaine et trafic routier. Pour les marqueurs mésenchymateux, les extraits organiques industriels et trafic routier, ainsi que les extraits hydrosolubles maritime, industriel et du trafic routier, ont augmenté leurs quantités de manière marquée.

De manière globale, l'influence du trafic routier après 7 jours d'exposition a induit les plus gros changements de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, dans le sens de la transition épithélio-mésenchymateuse. Les deux types d'extraits sous influence du trafic routier semblent induire la TEM de la même façon. Ces résultats sont confortés par l'étude morphologique, qui présente une transformation morphologique des cellules épithéliales vers une forme mésenchymateuse.

Plusieurs études ont étudié l'impact de l'exposition aux PM_{2.5} sur l'induction du mécanisme de TEM. Yang *et al.* (2017) ont exposé deux types de cellules pulmonaires, les cellules d'adénocarcinome A549 et les cellules d'un carcinome mucoépidermoïde H292, à 5, 10 et 20 µg.cm⁻² d'extrait hydrosoluble de PM_{2.5} d'origine urbaine issues de Shenyang, en Chine. Les auteurs ont obtenu des changements morphologiques visibles après 72 heures d'exposition et une diminution de la quantité de E-cadhérine, ainsi qu'une augmentation de la quantité de vimentine au niveau génique, protéique et visible par immunofluorescence. La TEM semble avoir été acquise dès 72 heures suite à ces expositions, notamment *via* les voies SMAD1, SMAD6 et SMAD7, et par l'activation de miR32. La TEM obtenue dans cette étude semble complète, à la différence de ce que l'on a pu observer suite aux 3 jours d'exposition à nos PM_{2.5}. Toutefois, les PM_{2.5} de l'étude de Yang *et al.* (2017) sont différentes des nôtres, notamment pour les composés majeurs qui sont Mn, Zr, et Cu.

Dans l'étude de Longhin *et al.* (2018), les cellules bronchiales HBEC3-KT ont été exposées aux PM_{2.5} issues de la zone urbaine de Milan, en Italie. Ces cellules ont été

Chapitre 5

Étude de l'impact des PM_{2.5} sur la TEM

exposées à des extraits hydrosolubles de PM_{2.5} à 10 µg.cm⁻² pendant 48 heures. Les auteurs ont observé des changements morphologiques, avec notamment une diminution de la quantité de la E-cadhérine, la réorganisation du cytosquelette d'actine mais pas de modulation de la quantité de vimentine. L'état de TEM est qualifié de précoce, et pourrait être comparé à nos résultats après 3 jours d'expositions aux extraits de PM_{2.5}.

Deux autres études ont étudié le rôle des PM_{2.5} et du stress mécanique, qui peut être induit par les mouvements de respiration sur les cellules pulmonaires, sur l'induction de la TEM (Barker *et al.* 2014 ; Dysart *et al.* 2014). Ces deux études ont exposé des cellules alvéolaires de rats pendant 5 jours à 0,1, 1 et 10 µg.cm⁻² d'extrait hydrosoluble de PM_{2.5} échantillonnées à Atlanta, aux États-Unis, sous influence du trafic routier. Les auteurs observent qu'une augmentation de la pression et de la quantité en PM_{2.5}, provoque une diminution de la quantité des marqueurs épithéliaux E-cadhérine et cytokératine. Une augmentation de la quantité du marqueur mésenchymateux α-SMA (actine mésenchymateuse) et de l'enzyme prolyl-4-hydroxylase est également observée. Après 5 jours d'exposition, les résultats de cette étude sont comparables à nos résultats à 7 jours d'expositions aux PM_{2.5}. Il est possible que la pression exercée sur les cellules augmente la vitesse d'apparition de la TEM.

Suite à l'obtention des résultats de TEM et des mécanismes de toxicité des PM_{2.5}, plusieurs voies de signalisations semblent être mises en jeu. En effet, l'exposition aux PM_{2.5} a activé certains médiateurs de l'inflammation, notamment IL-1β. L'activation d'IL-1β peut activer les récepteurs à IL-1β (IL-1β R), qui vont activer TRAF6 (Shi et Sun 2018). TRAF6 est impliqué dans l'activation de la TEM, notamment par l'activation du facteur de transcription Twist (Yamashita *et al.* 2008). IL-1β est également capable d'activer la voie NF-κB, elle-même capable d'auto-entretenir l'inflammation et d'activer plusieurs facteurs de transcription activateurs de TEM : Twist, *SNAI1*, *SNAI2*, et *ZEB1* (Julien *et al.* 2007). Un autre médiateur de l'inflammation, IL-6, est capable d'induire la TEM notamment par la voie JAK/STAT3 (Manore *et al.* 2022 ; Zhao *et al.* 2014). Toutefois, étant donné la faible induction de ce médiateur lors de l'exposition à nos extraits de PM_{2.5}, il est peu probable que cette voie soit la voie privilégiée pour l'induction de la TEM.

Au vu des résultats concernant la métabolisation des composés organiques et la réponse antioxydante, il semblerait que les voies Nrf-2 et AhR soient activées suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Ces deux voies peuvent être liées entre elles (Haarmann-Stemann *et al.* 2012 ; Nguyen *et al.* 2009), l'activation de AhR pouvant entraîner l'activation de Nrf2. De plus, ces deux voies peuvent induire le mécanisme de TEM.

AhR est notamment capable d'activer p38 et JNK (Weiss *et al.* 2005). Ces deux enzymes sont également activées dans les voies de signalisation de TGF-β, et sont capables

d'activer le facteur de transcription Twist (Chen *et al.* 2013 ; Jilany Khan *et al.* 2018). AhR est également capable d'activer le facteur de transcription *SNAI2* (Dietrich et Kaina 2010).

L'activation de la voie Nrf2 peut se faire *via* l'inhibition de GSK3 β (Cuadrado 2015 ; Yousef *et al.* 2022). L'inhibition de GSK3 β est également connue pour stabiliser la β -caténine et favoriser sa translocation dans le noyau, afin d'activer les facteurs de transcription de la TEM : *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* et *ZEB2* (Bachelder *et al.* 2005 ; Lamouille *et al.* 2014).

Il est possible que ces deux voies, AhR et Nrf2 soient impliquées dans l'activation de la TEM consécutive à l'exposition aux PM_{2.5}.

Concernant nos travaux, l'exposition aux extraits organiques ayant activé des réponses inflammatoires, de stress oxydant et de métabolisation, il est possible que l'ensemble de ces voies soient impliquées pour l'activation de la TEM. L'activation du mécanisme de TEM par les hydrocarbures aromatiques polycycliques a déjà été décrit, notamment lors de l'exposition à de la fumée de tabac (Vu *et al.* 2016).

Concernant les extraits hydrosolubles, la présence de métaux pourrait activer le mécanisme de TEM. En effet, il est connu que l'activation de la voie Src par les métaux peut conduire à l'activation des MMP impliquées dans la TEM (Patel *et al.* 2016 ; Senga *et al.* 2008). Des travaux menés sur l'exposition aux métaux présents dans la fumée de tabac, comme le cadmium montre également l'activation de la TEM après exposition (Stavrou *et al.* 2023). De plus, les ERO seraient également capable d'induire la TEM, notamment par l'activation de MMP3 et *SNAI1* selon plusieurs voies d'activation (Cannito *et al.* 2010). Ainsi, les métaux et les ERO présents dans les extraits hydrosolubles de PM_{2.5} pourraient être capables d'induire la TEM.

L'activation par les composés présents dans les particules atmosphériques, des voies pouvant induire une transition épithélio-mésenchymateuse est donc complexe.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

La pollution atmosphérique causée par les particules fines est classée cancérigène de groupe 1 par le CIRC depuis maintenant plus de 10 ans (Loomis *et al.* 2013). Ces PM_{2.5} sont également responsables de l'apparition de certaines maladies respiratoires tels que l'asthme et la BPCO (Bontinck *et al.* 2020 ; Hogg *et al.* 2017). La composition de ces PM_{2.5} est variée, et est dépendante du site où elles sont échantillonnées, mais également de la saisonnalité. Cette composition chimique va influencer la réponse pulmonaire et plus spécifiquement, la réponse cellulaire. Les cellules pulmonaires vont être capables de mettre en place certains mécanismes de défense, tel que l'inflammation, la réponse antioxydante et la métabolisation des xénobiotiques. Des mécanismes plus tardifs peuvent également avoir lieu suite à l'exposition aux PM_{2.5}, notamment le mécanisme de TEM qui est impliqué dans les maladies pulmonaires comme l'asthme, la BPCO et la progression métastatique des cancers.

Afin d'étudier la réponse cellulaire, et notamment le mécanisme de TEM, notre approche comprend plusieurs objectifs. Le premier est de caractériser des PM_{2.5} issues d'influences diverses. Quatre sites ont été sélectionnés pour leurs influences variées : maritime, industrielle, urbaine et du trafic routier. Les PM_{2.5} ont été collectées sur des filtres à l'aide d'un préleveur haut débit, pour ensuite étudier leurs caractéristiques chimiques de manière approfondie. Les PM_{2.5} ont ensuite été extraites sous deux formes, des extraits hydrosolubles et des extraits organiques, afin de répondre au deuxième objectif : l'étude de la cytotoxicité et des mécanismes de réponses activés suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Les indicateurs de toxicité étudiés sont la réponse inflammatoire, la réponse antioxydante et la métabolisation des xénobiotiques. Enfin, le mécanisme de TEM a été étudié, afin de vérifier si son induction est possible suite à l'exposition aux PM_{2.5}, mais également observer s'il existe des différences d'induction de TEM en fonction de l'origine des PM_{2.5}.

Le **premier objectif** du travail de thèse consistait en la caractérisation des PM_{2.5} issues de quatre sites sous influences contrastées. La composition principale des particules était similaire pour l'ensemble des influences, avec des composés majeurs identiques comme le carbone total, les ions nitrates et sulfates. Toutefois, les quatre influences se distinguaient de par des éléments traceurs de chacune des influences. De plus ces résultats ont été confirmés par l'étude par factorisation matricielle positive. Les teneurs en métaux de PM_{2.5} sur le site sous influence industrielle sont les plus élevées, notamment en Fe, K, Mn, Cu, Zn et Al. Des profils de sources spécifiques de la combustion et de l'aciérie présente à proximité ont été identifiées pour ce site, avec des contributions semblables à celles observées dans la

Conclusion et perspectives

littérature auparavant. L'influence maritime et portuaire se différencie par ses teneurs en V, associé à la combustion de fioul lourd, que l'on assimile aux émissions liées au trafic maritime. Pour l'influence du trafic routier les éléments métalliques caractéristiques tels que Cu, Zn et Ba sont présents sur ce site, qui possède à juste titre, la plus grande contribution de source d'émission caractéristique du trafic routier. En effet, ces éléments sont présents dans les huiles moteurs et les freins de véhicule. De plus, les composés organiques présents permettent également de différencier les sites, avec des concentrations en HAP plus importantes pour le site sous influence industrielle. Ces concentrations élevées en HAP s'accordent avec le TEQ plus important pour cette même influence. Les émissions industrielles seraient donc les plus problématiques en termes de toxicité. Les dérivés des HAP sont plus concentrés sur les sites sous influences industrielle et du trafic routier, et de manière plus prononcée pour les nitro-HAP sur le site sous influence du trafic routier. Les nitro-HAP sont notamment connus pour être présent lors de la combustion des échappements véhiculaire (Abbas *et al.* 2018). Les phtalates et bisphénol A sont présents davantage sur les sites sous influence du trafic routier et urbaine. Ces derniers composés peuvent provenir de l'incinération des déchets (Lu *et al.* 2020 ; Růžičková *et al.* 2016), mais ils n'ont été jusqu'alors que très peu étudiés.

Au vu des résultats de caractérisation chimique des échantillons de particules atmosphériques, il aurait été intéressant d'étudier certains composés organiques de manière journalière afin de les inclure dans les données d'identification des sources. De plus, certains composés comme les alcanes et le lévoglucosane peuvent servir à la caractérisation plus fine de source de combustion de biomasse, les hopanes afin de caractériser plus précisément le trafic routier. D'autres espèces comme le diméthylsulfur gazeux émis par les microalgues, pourrait être mesurés, *via* la quantification par chromatographie ionique de l'acide méthanesulfonique, afin de quantifier les émissions marines biogéniques.

Le **deuxième objectif** de thèse était d'étudier les effets toxiques des PM_{2.5} issues des quatre influences, en s'intéressant à la fraction organique et aux espèces hydrosolubles, sur des cellules pulmonaires, les cellules A549 et BEAS-2B. Les résultats de cytotoxicité et de viabilité cellulaire sont différents selon les modèles cellulaires. En effet, le modèle cellulaire BEAS-2B était plus sensible que le modèle A549, pour lequel les valeurs de CL₅₀ étaient plus élevées. Des mécanismes d'inflammation, de stress oxydant et de métabolisation des xénobiotiques ont été activés suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. L'extrait hydrosoluble des PM_{2.5} sous influence industrielle a induit les plus grandes réponses en termes d'inflammation, de stress oxydant et de métabolisation des xénobiotiques, en particulier sur

les cellules BEAS-2B. L'échantillon issu de l'influence trafic routier, sous forme hydrosoluble et organique, est également inducteur des mécanismes de toxicité étudiés. Les influences urbaine et maritime induisent des réactions minoritaires en comparaison aux deux autres influences. Il est possible que les voies AhR et Nrf2 soient impliquées dans l'induction de ces mécanismes étant donné les résultats obtenus pour la métabolisation des xénobiotiques et l'activation de HMOX1.

Afin d'étudier plus en détail les différents mécanismes d'action toxique, il serait intéressant de différencier plus précisément le type de mortalité cellulaire impliqué suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}. Cela peut se faire par exemple par la caractérisation en cytométrie en flux, des cellules qui peuvent posséder un phénotype apoptotique avec le marqueur cellulaire annexine V, ou un phénotype nécrotique avec le iodure de propidium, un marqueur de l'ADN.

L'induction de l'inflammation pourrait être étudiée plus finement. En effet, la cytokine IL-1 β est connue pour être liée à l'activation de l'inflammasome, qui est un mécanisme responsable de l'inflammation et qui peut induire la pyroptose. L'activation de ce groupement de protéine peut être induit par des xénobiotiques, notamment lors de l'activation par la voie NLRP3 (Guo *et al.* 2015). Cette voie peut être activée par l'activation du récepteur membranaire TLR4, par un efflux de potassium, ou par l'induction d'ERO mitochondriales. L'inflammasome se forme par l'oligomérisation de pro-caspases-1, celles-ci s'auto-clivent en caspase-1, et clivent à leur tour le précurseur pro-IL-1 β en IL-1 β . L'inflammasome est connu pour être induit dans des cellules immunitaires tels que des macrophages, mais dernièrement, des études ont montré la présence de ce groupement protéique dans des barrières épithéliales (Cao *et al.* 2022 ; Winsor *et al.* 2019). Il serait intéressant de vérifier si les extraits de PM_{2.5} peuvent activer l'inflammasome, par l'intermédiaire de tests fonctionnels de la caspase 1.

De plus, certaines cytokines n'ont pas pu être observées tel que IFN- γ . L'utilisation d'un système de coculture associant différents types cellulaires, tels que des cellules épithéliales et des cellules immunitaires, pourrait permettre de vérifier si les PM_{2.5} sont capables d'induire une augmentation d'IFN- γ , d'autant plus que cette cytokine est impliquée dans l'induction de la TEM.

Une autre cytokine pourrait également être étudiée, l'interleukine-17, qui est déjà impliquée dans la réponse de certains pathogènes potentiellement présents dans les PM_{2.5} (bactéries et champignons), mais également suite à des expositions de silice amorphe (Gurczynski et Moore 2018). La silice est présente sous forme de particules provenant d'origine naturelle (poussières crustales) ou anthropique (procédés industriels du béton et de la céramique, etc.) lorsqu'elle est cristallisée, mais peut aussi être sous forme amorphe suite

Conclusion et perspectives

à des procédés industriels de refroidissement rapide. Ces deux types de silices sont connus pour induire une réponse inflammatoire forte (Lo Re *et al.* 2010), et notamment la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T (Feray *et al.* 2022). Une étude met en avant la sécrétion de cette cytokine *in vitro* suite à l'exposition de lymphocytes T à des PM_{2.5} (Ma *et al.* 2017). D'autres études ont observé l'induction *in vivo* de cette cytokine suite aux expositions de PM_{2.5}. La sécrétion d'IL-17 va activer la réponse inflammatoire notamment par les voies NF-κB et MAPK, capables d'activer la sécrétion de TNF-α et IL-1β. La réponse inflammatoire induite peut ne pas se résoudre et une surexpression d'IL-17 peut entraîner un nombre important de mécanismes néfastes comme la sécrétion de médiateurs pro-fibrotiques, ou agir directement sur les cellules épithéliales pour induire la TEM. Des maladies chroniques comme l'asthme, la BPCO et la fibrose peuvent être induites par cette surstimulation par IL-17 (Gurczynski et Moore 2018). Il serait donc intéressant d'étudier cette cytokine lors d'une coculture cellulaire entre des cellules immunitaires et des cellules épithéliales, observer si la cytokine IL-17 est induite, et si une induction de TEM est présente avec ou sans l'ajout des cellules immunitaires exposées aux PM_{2.5}. De plus, les PM_{2.5} issues du secteur industriel de Dunkerque sont connues pour contenir des silices amorphes et cristallisées provenant des laitiers (scories) issues de haut fourneau et de l'industrie du Mn (Hernández-Pellón *et al.* 2017 ; Hleis *et al.* 2013). A cela s'ajoute une étude qui a mis en évidence l'induction de la TEM suite à l'exposition à de la silice amorphe (Thevenot *et al.* 2013).

Le potentiel oxydant a été étudié pour les différents extraits de PM_{2.5} et a montré des résultats en accord avec les réponses cellulaires, notamment pour l'extrait « hydrosoluble industriel » pour OP-DTT. En effet, la réponse cellulaire a montré, pour cet extrait, une modulation plus importante du glutathion et des enzymes NQO1, CAT, SOD et HMOX1 en faveur d'une induction de stress oxydant. L'extrait hydrosoluble de PM_{2.5} issu de l'influence urbaine a obtenu des valeurs élevées en OP-AA qui n'ont pas été en accord avec les résultats cellulaires. En effet, les cellules exposées à cette influence n'ont pas induit de réponse antioxydante forte. Ces deux méthodes ne doivent pas être séparées, il est important que l'étude de l'une ne se fasse pas sans l'autre, afin de s'assurer de leurs complémentarités. Les capacités antioxydantes de la cellule n'étant pas seulement enzymatique, il pourrait être intéressant de quantifier le traitement des ERO par les protéines de liaison aux métaux, tels que les métallothionéines, qui pourraient participer à la réponse antioxydante des métaux présents dans nos extraits de PM_{2.5}.

L'évaluation de la métabolisation des xénobiotiques a montré de fortes réponses des cytochromes CYP1A1 et CYP1B1 suite à l'exposition à l'ensemble des extraits organiques et

de façon plus forte que les extraits hydrosolubles. Par ailleurs, aucune modulation du CYP3A4 et CYP2B6 n'a pu être observée.

Par ailleurs, l'activation métabolique peut entraîner l'apparition de molécules plus réactives, qui induisent du stress oxydant. Certains composés comme les composés organiques hydrosolubles peuvent être activés lors des étapes de métabolisation. Il aurait été intéressant d'étudier la présence de certains composés organiques hydrosolubles, tel que les quinones et les acides carboxyliques présents dans l'air. De plus, les quinones sont possiblement présentes dans nos extraits de PM_{2.5} étant donné l'activation de NQO1 suite à l'exposition aux extraits.

Le **troisième objectif** de cette thèse concerne l'étude de l'induction du mécanisme de TEM sur les cellules A549 exposés aux extraits de PM_{2.5}. L'exposition pendant 3 jours entraîne un début de modification phénotypique visible par la diminution du marqueur épithélial E-cadhérine, et la faible augmentation des marqueurs mésenchymateux. Après 7 jours d'exposition aux extraits de PM_{2.5}, la morphologie et le phénotype des cellules est modifié. Les quantités de marqueurs épithéliaux sont diminuées et les quantités de marqueurs mésenchymateux sont augmentées, particulièrement pour les extraits de PM_{2.5} issues de l'influence du trafic routier.

Il serait intéressant d'étudier ce mécanisme plus précisément avec notamment la mise en évidence par immunofluorescence du changement des marqueurs suite aux expositions aux extraits de PM_{2.5}. En effet, cette méthode est couramment utilisée pour l'étude de la TEM et permet de dire avec plus de précision si les changements morphologiques induits sont bien dus à l'augmentation des marqueurs mésenchymateux aux localisations attendues. L'utilisation de plus de marqueurs serait également intéressante pour consolider ces premiers résultats, avec notamment l'étude des facteurs de transcription Snail (Cano *et al.* 2000), Slug (Joannes *et al.* 2014), Twist (Ansieau *et al.* 2008) et ZEB1/2 (Lamouille *et al.* 2014). Ces facteurs de transcriptions sont régulièrement étudiés pour l'activation des mécanismes de TEM et peuvent être activés par certains composés présents dans les extraits de particules atmosphériques testées.

Des tests de blessures et d'invasion doivent être réalisés également afin de renforcer les conclusions sur l'induction de la TEM par les extraits de PM_{2.5}. Ces tests permettent de vérifier que les cellules ont bien acquis les phénotypes mésenchymateux et sont capables de migrer et d'envahir des espaces, de la même manière que pour des cellules mésenchymateuses.

Conclusion et perspectives

Les miR, notamment la famille des miR200, sont connus pour induire ces phénomènes de TEM. La vérification de leur activation pourrait être intéressante suite à l'exposition aux extraits de PM_{2.5}.

De plus, des voies comme AhR, qui ont pu être activées suite à l'exposition aux particules, sont connues pour induire la TEM (Dietrich et Kaina 2010 ; Reyes-Reyes *et al.* 2016). Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur le lien entre l'activation de ce récepteur, la métabolisation des xénobiotiques et l'activation de la TEM. D'autres voies comme l'inflammation, l'activation de l'inflammasome, ou de cytokines comme IFN- γ et TNF- α , pourraient induire la TEM. Il serait intéressant de vérifier si l'activation de ces médiateurs de l'inflammation sont suffisant pour activer un mécanisme de TEM.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en relation l'activation de mécanismes de toxicité et la TEM suite à l'exposition à des extraits organiques et hydrosolubles de PM_{2.5} sur les modèles de cellules pulmonaires. Certains extraits dont l'extrait hydrosoluble sous influence industrielle a entraîné des réponses plus fortes en comparaison aux extraits d'autres influences. Les extraits de PM_{2.5} sous l'influence du trafic routier, quant à eux, ont été capables d'induire des réponses de toxicité et la TEM de manière plus prononcée au niveau de la modification phénotypique. Il serait intéressant d'étudier la réponse spécifique de cette influence sur l'activation de mécanismes identiques sur des tissus humain, afin d'étudier avec plus de précision ces effets. En effet, les modèles cellulaires utilisés ont leurs limites. Le modèle cellulaire A549 est un bon modèle pour l'étude la TEM, mais lors de l'étude de cytotoxicité ce modèle montre une résistance plus importante par rapport aux cellules BEAS-2B. De plus, les réponses inflammatoires des cellules A549 sont diamétralement opposées à celles des cellules BEAS-2B, qui semblent plus sensibles en comparaison.

Des modèles cellulaires plus récents, se rapprochant de conditions *in vivo* existent. Ces modèles permettent notamment aux cellules la transmissions de signaux, lors de cocultures par exemple entre des modèles épithéliaux, endothéliaux et de cellules immunitaires. D'autres modèles vont permettre de modéliser plus précisément les barrières pulmonaires comme les modèles mélangeant les différentes cellules épithéliales pulmonaires, avec notamment des cellules caliciformes, des cellules de Clara et des cellules basales. L'utilisation de ces modèles pourrait permettre d'étudier de façon plus précise les mécanismes impliqués.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbas, Imane, Badran, Ghidaa, Verdin, Anthony, Ledoux, Frédéric, Roumie, Mohamed, Lo Guidice, Jean-Marc, Courcot, Dominique et Garçon, Guillaume. 2019. « In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation », *Environmental Research*, vol. 171, p. 510-522.

Abbas, Imane, Badran, Ghidaa, Verdin, Anthony, Ledoux, Frédéric, Roumié, Mohamed, Courcot, Dominique et Garçon, Guillaume. 2018. « Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity », *Environmental Chemistry Letters*, vol. 16, n° 2, p. 439-475.

Acloque, Hervé, Adams, Meghan S., Fishwick, Katherine, Bronner-Fraser, Marianne et Nieto, M. Angela. 2009. « Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, n° 6, p. 1438-1449.

Adhikari, Atin. 2020. « Chapter 1 - Introduction to spatiotemporal variations of ambient air pollutants and related public health impacts », in Li, Zhou et Tong (dir.), *Spatiotemporal Analysis of Air Pollution and Its Application in Public Health* Elsevier, p. 1-34.

Agarwal, Sandeep K. 2014. « Integrins and cadherins as therapeutic targets in fibrosis », *Frontiers in Pharmacology*, vol. 5.

Ahookhosh, Kaveh, Pourmehran, Oveis, Aminfar, Habib, Mohammadpourfard, Mousa, Sarafraz, Mohammad Mohsen et Hamishehkar, Hamed. 2020. « Development of human respiratory airway models: A review », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 145, p. 105233.

Aksorn, Nithikoon et Chanvorachote, Pithi. 2019. « Integrin as a molecular target for anti-cancer approaches in lung cancer », *Anticancer Research*, vol. 39, n° 2, p. 541-548.

Alleman, Laurent Y., Lamaison, Laure, Perdrix, Esperanza, Robache, Antoine et Galloo, Jean-Claude. 2010. « PM₁₀ metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone », *Atmospheric Research*, vol. 96, n° 4, p. 612-625.

Amato, F., Pandolfi, M., Escrig, A., Querol, X., Alastuey, A., Pey, J., Perez, N. et Hopke, P. K. 2009. « Quantifying road dust resuspension in urban environment by Multilinear Engine: A comparison with PM_{2.5} », *Atmospheric Environment*, vol. 43, n° 17, p. 2770-2780.

Ancel, Julien, Birembaut, Philippe, Dewolf, Maxime, Durlach, Anne, Nawrocki-Raby, Béatrice, Dalstein, Véronique, Delepine, Gonzague, Blacher, Silvia, Deslée, Gaëtan, Gilles, Christine et Polette, Myriam. 2019. « Programmed death–ligand 1 and vimentin: A tandem marker as prognostic factor in NSCLC », *Cancers*, vol. 11, n° 10, p. 1411.

Andersen, Zorana Jovanovic, Bønnelykke, Klaus, Hvidberg, Martin, Jensen, Steen S., Ketzel, Matthias, Loft, Steffen, Sørensen, Mette, Tjønneland, Anne, Overvad, Kim et Raaschou-Nielsen, Ole. 2012. « Long-term exposure to air pollution and asthma hospitalisations in older adults: a cohort study », *Thorax*, vol. 67, n° 1, p. 6-11.

Anenberg, Susan C., Henze, Daven K., Tinney, Veronica, Kinney, Patrick L., MacNee, William, Fann, Neal, Malley, Chris S., Roman, Henry, Lamsal, Lok, Duncan, Bryan, Martin, Randall V., Donkelaar, Aaron van, Brauer, Michael, Doherty, Ruth, Jonson, Jan Eiof, Davila, Yanko, Sudo,

Références bibliographiques

- Kengo et Kuylenstierna, Johan C.I. 2018. « Estimates of the global burden of ambient PM2.5, ozone, and NO2 on asthma incidence and emergency room visits », *Environmental Health Perspectives*, vol. 126, n° 10, p. 107004.
- Ansieau, Stéphane, Bastid, Jeremy, Doreau, Agnès, Morel, Anne-Pierre, Bouchet, Benjamin P., Thomas, Clémence, Fauvet, Frédérique, Puisieux, Isabelle, Doglioni, Claudio, Piccinin, Sara, Maestro, Roberta, Voeltzel, Thibault, Selmi, Abdelkader, Valsesia-Wittmann, Sandrine, Caron de Fromentel, Claude et Puisieux, Alain. 2008. « Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence », *Cancer Cell*, vol. 14, n° 1, p. 79-89.
- Anwar-Mohamed, Anwar, Elbekai, Reem H et El-Kadi, Ayman OS. 2009. « Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism », *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 5, n° 5, p. 501-521.
- Arooj, Madeeha, Ali, Irshad, Kang, Hee Kyoung, Hyun, Jin Won et Koh, Young-Sang. 2020. « Inhibitory effect of particulate matter on toll-like receptor 9 stimulated dendritic cells by downregulating mitogen-activated protein kinase and NF-κB pathway », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 83, n° 9, p. 341-350.
- ATCC. 2021. « A549 ATCC® CCL-185™ », URL : <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx#generalinformation>, consulté le 14 novembre 2019.
- Atmo Hauts-de-France. 2019. *Rapport méthodologique de l'inventaire des émissions atmosphériques en Hauts-de-France*, Atmo Hauts-de-France, Observatoire de l'Air, 55 place Rihour 59044 Lille Cedex : Atmo Hauts-de-France.
- Atmo Hauts-de-France. 2016. *Perturbateurs endocriniens – Surveillance dans l'air des départements du Nord et du Pas-de-Calais* Atmo Hauts-de-France.
- ATSDR. 2022. *Guidance for Calculating Benzo(a)pyrene Equivalents for Cancer Evaluations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service : Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Aust, Ann E. et Eveleigh, Jamie F. 1999. « Mechanisms of DNA Oxidation », *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 222, n° 3, p. 246-252.
- Bachelder, Robin E., Yoon, Sang-Oh, Franci, Clara, Herreros, Antonio García de et Mercurio, Arthur M. 2005. « Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription implications for the epithelial–mesenchymal transition », *Journal of Cell Biology*, vol. 168, n° 1, p. 29-33.
- Badran, Ghidaa, Ledoux, Frédéric, Verdin, Anthony, Abbas, Imane, Roumie, Mohamed, Genevray, Paul, Landkocz, Yann, Lo Guidice, Jean-Marc, Garçon, Guillaume et Courcot, Dominique. 2020. « Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions », *Chemosphere*, vol. 243, p. 125440.
- Badran, Ghidaa, Verdin, Anthony, Grare, Céline, Abbas, Imane, Achour, Djamel, Ledoux, Frédéric, Roumie, Mohamad, Cazier, Fabrice, Courcot, Dominique, Lo Guidice, Jean-Marc et Garçon, Guillaume. 2020. « Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM2.5-0.3) and quasi-ultrafine (PM0.3) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells », *Environmental Pollution*, vol. 263, p. 114620.

Références bibliographiques

- Baeza-Squiban, A., Bonvallot, V., Boland, S. et Marano, F. 1999. « Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors », *Cell Biology and Toxicology*, vol. 15, n° 6, p. 375-380.
- Bai, Hongzhen, Wu, Min, Zhang, Hongjian et Tang, Guping. 2017. « Chronic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure causes DNA damage and genomic instability in lung epithelial cells », *Oncotarget*, vol. 8, n° 45, p. 79034-79045.
- Bakin, Andrei V., Tomlinson, Anne K., Bhowmick, Neil A., Moses, Harold L. et Arteaga, Carlos L. 2000. « Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 47, p. 36803-36810.
- Balásházy, Imre, Hofmann, Werner et Heistracher, Thomas. 2003. « Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer », *Journal of Applied Physiology*, vol. 94, n° 5, p. 1719-1725.
- Barker, Thomas H., Dysart, Marilyn M., Brown, Ashley C., Douglas, Alison M., Fiore, Vincent F., Russell, Armistead G., et HEI Health Review Committee. 2014. « Synergistic effects of particulate matter and substrate stiffness on epithelial-to-mesenchymal transition », *Research Report (Health Effects Institute)*, n° 182, p. 3-41.
- Bates, Josephine T., Fang, Ting, Verma, Vishal, Zeng, Linghan, Weber, Rodney J., Tolbert, Paige E., Abrams, Joseph Y., Sarnat, Stefanie E., Klein, Mitchel, Mulholland, James A. et Russell, Armistead G. 2019. « Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects », *Environmental Science & Technology*, vol. 53, n° 8, p. 4003-4019.
- Baulig, Augustin, Singh, Seema, Marchand, Alexandre, Schins, Roel, Barouki, Robert, Garlatti, Michèle, Marano, Francelyne et Baeza-Squiban, Armelle. 2009. « Role of Paris PM_{2.5} components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells », *Toxicology*, vol. 261, n° 3, p. 126-135.
- Belgacemi, Randa, Luczka, Emilie, Ancel, Julien, Diabasana, Zania, Perotin, Jeanne-Marie, Germain, Adeline, Lalun, Nathalie, Birembaut, Philippe, Dubernard, Xavier, Mérol, Jean-Claude, Delepine, Gonzague, Polette, Myriam, Deslée, Gaëtan et Dormoy, Valérian. 2020. « Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD », *EBioMedicine*, vol. 51, p. 102572.
- Belis, C. A., Pikridas, M., Lucarelli, F., Petralia, E., Cavalli, F., Calzolari, G., Berico, M. et Sciare, J. 2019. « Source apportionment of fine PM by combining high time resolution organic and inorganic chemical composition datasets », *Atmospheric Environment: X*, vol. 3, p. 100046.
- Billet, Sylvain, Abbas, Imane, Goff, Jérémie Le, Verdin, Anthony, André, Véronique, Lafargue, Paul-Eric, Hachimi, Adam, Cazier, Fabrice, Sichel, François, Shirali, Pirouz et Garçon, Guillaume. 2008. « Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells », *Cancer Letters*, vol. 270, n° 1, p. 144-155.
- Billet, Sylvain, Garçon, Guillaume, Dagher, Zeina, Verdin, Anthony, Ledoux, Frédéric, Cazier, Fabrice, Courcot, Dominique, Aboukais, Antoine et Shirali, Pirouz. 2007. « Ambient particulate matter (PM_{2.5}): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549) », *Environmental Research*, vol. 105, n° 2, p. 212-223.

Références bibliographiques

Billet, Sylvain, Landkocz, Yann, Martin, Perrine J., Verdin, Anthony, Ledoux, Frédéric, Lepers, Capucine, André, Véronique, Cazier, Fabrice, Sichel, François, Shirali, Pirouz, Gosset, Pierre et Courcot, Dominique. 2018. « Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 71, p. 168-178.

Bocchi, Clara, Bazzini, Cristina, Fontana, Federica, Pinto, Giancarlo, Martino, Anna et Cassoni, Francesca. 2019. « Characterization of urban aerosol: Seasonal variation of genotoxicity of the water-soluble portion of PM_{2.5} and PM₁ », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 841, p. 23-30.

Bontinck, Annelies, Maes, Tania et Joos, Guy. 2020. « Asthma and air pollution: recent insights in pathogenesis and clinical implications », *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 26, n° 1, p. 10-19.

Borgie, Mireille, Dagher, Zeina, Ledoux, Frédéric, Verdin, Anthony, Cazier, Fabrice, Martin, Perrine, Hachimi, Adam, Shirali, Pirouz, Greige-Gerges, Hélène et Courcot, Dominique. 2015. « Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells », *Environmental Pollution*, vol. 205, p. 250-260.

Brabletz, Thomas, Kalluri, Raghu, Nieto, M. Angela et Weinberg, Robert A. 2018. « EMT in cancer », *Nature Reviews Cancer*, vol. 18, n° 2, p. 128-134.

Brandsma, Corry-Anke, Berge, Maarten Van den, Hackett, Tillie-Louise, Brusselle, Guy et Timens, Wim. 2020. « Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: From disease mechanisms to precision medicine », *The Journal of Pathology*, vol. 250, p. 624-635.

Briscoe, James et Théron, Pascal P. 2013. « The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, n° 7, p. 416-429.

Brown, Ashley C., Fiore, Vincent F., Sulchek, Todd A. et Barker, Thomas H. 2013. « Physical and chemical microenvironmental cues orthogonally control the degree and duration of fibrosis-associated epithelial-to-mesenchymal transitions », *The Journal of Pathology*, vol. 229, n° 1, p. 25-35.

Bruckmann, Peter, Hiester, Ernst, Klees, Marcel et Zetzsch, Cornelius. 2013. « Trends of PCDD/F and PCB concentrations and depositions in ambient air in Northwestern Germany », *Chemosphere*, vol. 93, n° 8, p. 1471-1478.

Burke, J. Daniel et Young, Howard A. 2019. « IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place », *Seminars in Immunology*, vol. 43, p. 101280.

Çakmak, Gonca, Ertürk Arı, Pelin, Emerge, Esra, Arı, Akif, Odabaşı, Mustafa, Schins, Roel, Burgaz, Sema et Gaga, Eftade O. 2019. « Investigation of spatial and temporal variation of particulate matter in vitro genotoxicity and cytotoxicity in relation to the elemental composition », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 842, p. 22-34.

Calcabrini, Annarica, Meschini, Stefania, Marra, Manuela, Falzano, Loredana, Colone, Marisa, Berardis, Barbara De, Paoletti, Luigi, Arancia, Giuseppe et Fiorentini, Carla. 2004. « Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells », *Environmental Research*, vol. 95, n° 1, p. 82-91.

- Cannito, Stefania, Novo, Erica, Bonzo, Lorenzo Valfrè di, Busletta, Chiara, Colombatto, Sebastiano et Parola, Maurizio. 2010. « Epithelial–Mesenchymal Transition: From Molecular Mechanisms, Redox Regulation to Implications in Human Health and Disease », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 12, n° 12, p. 1383-1430.
- Cano, Amparo, Pérez-Moreno, Mirna A., Rodrigo, Isabel, Locascio, Annamaria, Blanco, María J., Barrio, Marta G. del, Portillo, Francisco et Nieto, M. Angela. 2000. « The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression », *Nature Cell Biology*, vol. 2, n° 2, p. 76-83.
- Cao, Wei, Wang, Xiang, Li, Jiulong, Yan, Ming, Chang, Chong Hyun, Kim, Joshua, Jiang, Jinhong, Liao, Yu-Pei, Tseng, Shannon, Kusumoputro, Sydney, Lau, Candice, Huang, Marissa, Han, Pengli, Lu, Pengju et Xia, Tian. 2022. « NLRP3 inflammasome activation determines the fibrogenic potential of PM2.5 air pollution particles in the lung », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 111, p. 429-441.
- Castañeda, Alejandro R., Bein, Keith J., Smiley-Jewell, Suzette et Pinkerton, Kent E. 2017. « Fine particulate matter (PM2.5) enhances allergic sensitization in BALB/c mice », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 80, n° 4, p. 197-207.
- Cavaillon, Jean-Marc. 2018. « Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines », *Toxicon*, vol. 149, p. 45-53.
- Cesari, Daniela, Merico, Eva, Grasso, Fabio Massimo, Decesari, Stefano, Belosi, Franco, Manarini, Francesco, De Nuntiis, Paola, Rinaldi, Matteo, Volpi, Francesca, Gambaro, Andrea, Morabito, Elisa et Contini, Daniele. 2019. « Source Apportionment of PM2.5 and of its Oxidative Potential in an Industrial Suburban Site in South Italy », *Atmosphere*, vol. 10, n° 12, p. 758.
- Chang, Han, Chang, Louis W., Cheng, Ya-Hsin, Tsai, Wen-Tin, Tsai, Ming-Xian et Lin, Pinpin. 2006. « Preferential Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-Positive Cells », *Toxicological Sciences*, vol. 89, n° 1, p. 205-213.
- Chen, Chih-Cheng, Chen, Pei-Shih et Yang, Chun-Yuh. 2019. « Relationship between fine particulate air pollution exposure and human adult life expectancy in Taiwan », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 82, n° 14, p. 826-832.
- Chen, Hai-hua, Zhou, Xian-long, Shi, Yu-lu et Yang, Jiong. 2013. « Roles of p38 MAPK and JNK in TGF- β 1-induced Human Alveolar Epithelial to Mesenchymal Transition », *Archives of Medical Research*, vol. 44, n° 2, p. 93-98.
- Chen, Shen, Li, Daochuan, Wu, Xiaonen, Chen, Liping, Zhang, Bin, Tan, Yafei, Yu, Dianke, Niu, Yong, Duan, Huawei, Li, Qiong, Chen, Rui, Aschner, Michael, Zheng, Yuxin et Chen, Wen. 2020. « Application of cell-based biological bioassays for health risk assessment of PM2.5 exposure in three megacities, China », *Environment International*, vol. 139, p. 105703.
- Chen, Shengguang, Wu, Xianzheng, Hu, Jiawen, Dai, Guoxing, Rong, Aihong et Guo, Gang. 2017. « PM2.5 exposure decreases viability, migration and angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells and human microvascular endothelial cells », *Molecular Medicine Reports*, vol. 16, n° 3, p. 2425-2430.
- Chen, Xi, Peng, Hongbing, Xiao, Jian, Guan, Anqi, Xie, Bin, He, Bixiu et Chen, Qiong. 2017. « Benzo(a)pyrene enhances the EMT-associated migration of lung adenocarcinoma A549 cells by upregulating Twist1 », *Oncology Reports*, vol. 38, n° 4, p. 2141-2147.

Références bibliographiques

Cheung, Kalam, Daher, Nancy, Kam, Winnie, Shafer, Martin M., Ning, Zhi, Schauer, James J. et Sioutas, Constantinos. 2011. « Spatial and temporal variation of chemical composition and mass closure of ambient coarse particulate matter (PM_{10-2.5}) in the Los Angeles area », *Atmospheric Environment*, vol. 45, n° 16, p. 2651-2662.

Chi, Yulang, Huang, Qiansheng, Lin, Yi, Ye, Guozhu, Zhu, Huimin et Dong, Sijun. 2018. « Epithelial-mesenchymal transition effect of fine particulate matter from the Yangtze River Delta region in China on human bronchial epithelial cells », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 66, p. 155-164.

Ching, Joseph et Kajino, Mizuo. 2018. « Aerosol mixing state matters for particles deposition in human respiratory system », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, p. 1-11.

Choo, Wun Hak, Park, Cho Hee, Jung, Shi Eun, Moon, Byeonghak, Ahn, Huiyeon, Ryu, Jung Seok, Kim, Keun-Soo, Lee, Yong Hwa, Yu, Il Je et Oh, Seung Min. 2016. « Long-term exposures to low doses of silver nanoparticles enhanced in vitro malignant cell transformation in non-tumorigenic BEAS-2B cells », *Toxicology in Vitro*, vol. 37, p. 41-49.

Cochard, Margaux, Ledoux, Frédéric et Landkocz, Yann. 2020. « Atmospheric fine particulate matter and epithelial mesenchymal transition in pulmonary cells: state of the art and critical review of the in vitro studies », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 23, n° 7, p. 293-318.

Cohen, Aaron J, Brauer, Michael, Burnett, Richard, Anderson, H Ross, Frostad, Joseph, Estep, Kara, Balakrishnan, Kalpana, Brunekreef, Bert, Dandona, Lalit, Dandona, Rakhi, Feigin, Valery, Freedman, Greg, Hubbell, Bryan, Jobling, Amelia, Kan, Haidong, Knibbs, Luke, Liu, Yang, Martin, Randall, Morawska, Lidia, Pope, C Arden, Shin, Hwashin, Straif, Kurt, Shaddick, Gavin, Thomas, Matthew, Dingenen, Rita van, Donkelaar, Aaron van, Vos, Theo, Murray, Christopher J L et Forouzanfar, Mohammad H. 2017. « Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: An analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015 », *The Lancet*, vol. 389, n° 10082, p. 1907-1918.

Colombo, Andrea, Benfenati, Emilio, Bugatti, Simona Grazia, Lodi, Marco, Mariani, Alessandro, Musmeci, Loredana, Rotella, Giuseppe, Senese, Vincenzo, Ziemacki, Giovanni et Fanelli, Roberto. 2013. « PCDD/Fs and PCBs in ambient air in a highly industrialized city in Northern Italy », *Chemosphere*, vol. 90, n° 9, p. 2352-2357.

Crobeddu, Bélinda, Aragao-Santiago, Leticia, Bui, Linh-Chi, Boland, Sonja et Baeza Squiban, Armelle. 2017. « Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress », *Environmental Pollution*, vol. 230, p. 125-133.

CROSS Gris-Nez. 2020. « La surveillance de la navigation maritime - CROSS Gris Nez », URL : <http://www.cross-grisnez.developpement-durable.gouv.fr/la-surveillance-de-la-navigation-maritime-r29.html>, consulté le 11 mai 2021.

Cuadrado, Antonio. 2015. « Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/β-TrCP », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 88, p. 147-157.

Cui, Shuo, He, Zhong-zhou, Zhu, Zi-wei, Sun, Zhao, Xu, Yi-tong, Wang, Jia-liang, Bao, Yan-ying, Ji, De-yu, Liu, Shun, Liu, Jing-tai, Zhang, Jin-hui et Wang, Qi. 2015. « Microfluidic analysis of PM_{2.5}-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial 16HBE cells », *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 19, n° 2, p. 263-272.

Cusack, M., Pérez, N., Pey, J., Alastuey, A. et Querol, X. 2013. « Source apportionment of fine PM and sub-micron particle number concentrations at a regional background site in the

western Mediterranean: a 2.5 year study », *Atmospheric Chemistry and Physics*, vol. 13, n° 10, p. 5173-5187.

D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M. et Liccardi, G. 2010. « Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: An update », *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, vol. 20, n° 2, p. 95-102.

Darquenne, Chantal. 2012. « Aerosol Deposition in Health and Disease », *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, vol. 25, n° 3, p. 140-147.

Dauphin, Maryline, Barbe, Coralie, Lemaire, Sarah, Nawrocki-Raby, Béatrice, Lagonotte, Eymeric, Delepine, Gonzague, Birembaut, Philippe, Gilles, Christine et Polette, Myriam. 2013. « Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non-small cell lung carcinomas », *Lung Cancer*, vol. 81, n° 1, p. 117-122.

Delmas, Robert, Mégie, Gérard et Peuch, Vincent-Henri (dir.). 2007. *Physique et chimie de l'atmosphère*, Paris : Belin.

Dergham, Mona, Lepers, Capucine, Verdin, Anthony, Cazier, Fabrice, Billet, Sylvain, Courcot, Dominique, Shirali, Pirouz et Garçon, Guillaume. 2015. « Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) », *Environmental Research*, vol. 137, p. 256-267.

Dergham, Mona, Lepers, Capucine, Verdin, Anthony, Billet, Sylvain, Cazier, Fabrice, Courcot, Dominique, Shirali, Pirouz et Garçon, Guillaume. 2012. « Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B) », *Chemical Research in Toxicology*, vol. 25, n° 4, p. 904-919.

Despréaux, Philomène, Jeanton, Capucine, Desaulle, Dorota, Al Zallouha, Margueritta, Verdin, Anthony, Momas, Isabelle et Achard, Sophie. 2023. « Innovative graph analysis method to assess gene expression modulation after fine particles exposures of 3D human airway epithelia », *Environmental Research*, vol. 221, p. 115296.

Di, Qian, Wang, Yan, Zanobetti, Antonella, Wang, Yun, Koutrakis, Petros, Choirat, Christine, Dominici, Francesca et Schwartz, Joel D. 2017. « Air Pollution and Mortality in the Medicare Population », *New England Journal of Medicine*, vol. 376, n° 26, p. 2513-2522.

Dieme, Denis, Cabral-Ndior, Mathilde, Garçon, Guillaume, Verdin, Anthony, Billet, Sylvain, Cazier, Fabrice, Courcot, Dominique, Diouf, Amadou et Shirali, Pirouz. 2012. « Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal) », *Environmental Research*, vol. 113, p. 1-13.

Dietrich, Cornelia et Kaina, Bernd. 2010. « The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth », *Carcinogenesis*, vol. 31, n° 8, p. 1319-1328.

Doehn, Ulrik, Hauge, Camilla, Frank, Scott R., Jensen, Claus J., Duda, Katarzyna, Nielsen, Jakob V., Cohen, Michael S., Johansen, Jens V., Winther, Benny R., Lund, Leif R., Winther, Ole, Taunton, Jack, Hansen, Steen H. et Frödin, Morten. 2009. « RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells », *Molecular Cell*, vol. 35, n° 4, p. 511-522.

Références bibliographiques

Doerner, Astrid M. et Zuraw, Bruce L. 2009. « TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids », *Respiratory Research*, vol. 10, n° 1, p. 100.

Dornhof, Regina, Maschowski, Christoph, Osipova, Anastasiya, Gieré, Reto, Seidl, Maximilian, Merfort, Irmgard et Humar, Matjaz. 2017. « Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM2.5 from biomass combustion », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 7, p. e0180291.

Dou, Changming, Zhang, Jie et Qi, Cuicui. 2018. « Cooking oil fume-derived PM2.5 induces apoptosis in A549 cells and MAPK/NF- κ B/STAT1 pathway activation », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, n° 10, p. 9940-9948.

DREAL Hauts-de-France. 2021. « Cartes de trafics annuels », URL : <https://www.hauts-de-france.developpement-durable.gouv.fr/?Cartes-de-trafic-annuels>, consulté le 12 octobre 2021.

DREAL Hauts-de-France. 2020. *Bilan d'activités annuel 2019 - L'inspection des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE)*DREAL.

DREAL Hauts-de-France. 2019. *Bilan d'activités annuel 2018*.

Dysart, Marilyn M., Galvis, Boris R., Russell, Armistead G. et Barker, Thomas H. 2014. « Environmental particulate (PM2.5) augments stiffness-induced alveolar epithelial cell mechanoactivation of transforming growth factor beta », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 9, p. e106821.

European Environment Agency. 2020. *Air quality in Europe: 2020 report.*, LU : Publications Office.

European Environment Agency. 2019. *Air quality in Europe - 2019 Report*, Luxembourg: Publications Office of the European Union : .

European Environment Agency. et European Maritime Safety Agency. 2021. *European maritime transport environmental report 2021.*, LU : Publications Office.

Fabretti, Jean-François, Sauret, Nathalie, Gal, Jean-François, Maria, Pierre-Charles et Schäerer, Urs. 2009. « Elemental characterization and source identification of PM2.5 using Positive Matrix Factorization: The Malraux road tunnel, Nice, France », *Atmospheric Research*, vol. 94, n° 2, p. 320-329.

Fadel, Marc. 2021. *Caractérisation des aérosols et de leurs sources dans des sites Est Méditerranéens sous influence industrielle*, Université du Littoral Côte d'Opale.

Fadel, Marc, Courcot, Dominique, Seigneur, Marianne, Kfoury, Adib, Oikonomou, Konstantina, Sciare, Jean, Ledoux, Frédéric et Afif, Charbel. 2023. « Identification and apportionment of local and long-range sources of PM2.5 in two East-Mediterranean sites », *Atmospheric Pollution Research*, vol. 14, n° 1, p. 101622.

Fadel, Marc, Ledoux, Frédéric, Farhat, Mariana, Kfoury, Adib, Courcot, Dominique et Afif, Charbel. 2021. « PM2.5 characterization of primary and secondary organic aerosols in two urban-industrial areas in the East Mediterranean », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 101, p. 98-116.

Fagerberg, Linn, Hallström, Björn M., Oksvold, Per, Kampf, Caroline, Djureinovic, Dijana, Odeberg, Jacob, Habuka, Masato, Tahmasebpour, Simin, Danielsson, Angelika, Edlund, Karolina, Asplund, Anna, Sjöstedt, Evelina, Lundberg, Emma, Szgyarto, Cristina Al-Khalili, Skogs, Marie, Takanen, Jenny Ottosson, Berling, Holger, Tegel, Hanna, Mulder, Jan, Nilsson,

- Peter, Schwenk, Jochen M., Lindskog, Cecilia, Danielsson, Frida, Mardinoglu, Adil, Sivertsson, Asa, Feilitzen, Kalle von, Forsberg, Mattias, Zwahlen, Martin, Olsson, IngMarie, Navani, Sanjay, Huss, Mikael, Nielsen, Jens, Ponten, Fredrik et Uhlén, Mathias. 2014. « Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics », *Molecular & cellular proteomics: MCP*, vol. 13, n° 2, p. 397-406.
- Fan, Jingchun, Li, Shulan, Fan, Chunling, Bai, Zhenggang et Yang, Kehu. 2016. « The impact of PM_{2.5} on asthma emergency department visits: A systematic review and meta-analysis », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, n° 1, p. 843-850.
- Farghadan, Ali, Poorbahrami, Kamran, Jalal, Sahar, Oakes, Jessica M., Coletti, Filippo et Arzani, Amirhossein. 2020. « Particle transport and deposition correlation with near-wall flow characteristic under inspiratory airflow in lung airways », *Computers in Biology and Medicine*, vol. 120, p. 103703.
- Feray, Alexia, Guillet, Éléonore, Szely, Natacha, Hullo, Marie, Legrand, François-Xavier, Brun, Emilie, Rabilloud, Thierry, Pallardy, Marc et Biola-Vidamment, Armelle. 2022. « Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles Promote Human Dendritic Cell Maturation and CD4+ T-Lymphocyte Activation », *Toxicological Sciences*, vol. 185, n° 1, p. 105-116.
- Francart, Marie-Emilie, Lambert, Justine, Vanwynsberghe, Aline M., Thompson, Erik W., Bourcy, Morgane, Polette, Myriam et Gilles, Christine. 2018. « Epithelial–mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases », *Developmental Dynamics*, vol. 247, n° 3, p. 432-450.
- Freshney, R. Ian. 2015. *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications*, 7th Edition John Wiley & Sons, 758.
- Fu, Pingqing et Kawamura, Kimitaka. 2010. « Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere », *Environmental Pollution*, vol. 158, n° 10, p. 3138-3143.
- Fu, You, Lu, Runze, Cui, Jian, Sun, Hao, Yang, Hongbao, Meng, Qingtao, Wu, Shenshen, Aschner, Michael, Li, Xiaobo et Chen, Rui. 2019. « Inhibition of ATP citrate lyase (ACLY) protects airway epithelia from PM_{2.5}-induced epithelial-mesenchymal transition », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 167, p. 309-316.
- Fuentes-Mattei, Enrique, Rivera, Evasomary, Gioda, Adriana, Sanchez-Rivera, Diana, Roman-Velazquez, Felix R. et Jimenez-Velez, Braulio D. 2010. « Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to study immunological markers resulting from exposure to PM_{2.5} organic extract from Puerto Rico », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 243, n° 3, p. 381-389.
- Galvão, Elson Silva, Reis, Neyval Costa et Santos, Jane Meri. 2020. « The role of receptor models as tools for air quality management: a case study of an industrialized urban region », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 27, n° 29, p. 35918-35929.
- Gao, Dong, Godri Pollitt, Krystal J., Mulholland, James A., Russell, Armistead G. et Weber, Rodney J. 2020. « Characterization and comparison of PM_{2.5} oxidative potential assessed by two acellular assays », *Atmospheric Chemistry and Physics*, vol. 20, n° 9, p. 5197-5210.
- Gao, Dong, Mulholland, James A., Russell, Armistead G. et Weber, Rodney J. 2020. « Characterization of water-insoluble oxidative potential of PM_{2.5} using the dithiothreitol assay », *Atmospheric Environment*, vol. 224, p. 117327.

Références bibliographiques

- Gao, Meili, Zheng, Aqun, Chen, Lan, Dang, Fan, Liu, Xiaojing et Gao, Jianghong. 2020. « Benzo(a)pyrene affects proliferation with reference to metabolic genes and ROS/HIF-1 α /HO-1 signaling in A549 and MCF-7 cancer cells », *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 0, n° 0, p. 1-9.
- Gao, Min, Jia, Ruizhi, Qiu, Tianlei, Han, Meilin, Song, Yuan et Wang, Xuming. 2015. « Seasonal size distribution of airborne culturable bacteria and fungi and preliminary estimation of their deposition in human lungs during non-haze and haze days », *Atmospheric Environment*, vol. 118, p. 203-210.
- Garcia-Canton, Carolina, Minet, Emmanuel, Anadon, Arturo et Meredith, Clive. 2013. « Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example », *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, vol. 27, n° 6, p. 1719-1727.
- Garon, Edward B., Chih-Hsin Yang, James et Dubinett, Steven M. 2020. « The Role of Interleukin 1 β in the Pathogenesis of Lung Cancer », *JTO Clinical and Research Reports*, vol. 1, n° 1, p. 100001.
- Ghio, Andrew J., Carraway, Martha Sue et Madden, Michael C. 2012. « Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 15, n° 1, p. 1-21.
- Gietl, Johanna K., Lawrence, Roy, Thorpe, Alistair J. et Harrison, Roy M. 2010. « Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road », *Atmospheric Environment*, vol. 44, n° 2, p. 141-146.
- Gilli, G., Pignata, C., Schilirò, T., Bono, R., La Rosa, A. et Traversi, D. 2007. « The mutagenic hazards of environmental PM_{2.5} in Turin », *Environmental Research*, vol. 103, n° 2, p. 168-175.
- Gogou, Alexandra, Stratigakis, Nikolaos, Kanakidou, Maria et Stephanou, Euripides G. 1996. « Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories », *Organic Geochemistry*, vol. 25, n° 1, p. 79-96.
- Gohy, S. T., Hupin, C., Pilette, C. et Ladjemi, M. Z. 2016. « Chronic inflammatory airway diseases: the central role of the epithelium revisited », *Clinical & Experimental Allergy*, vol. 46, n° 4, p. 529-542.
- Gohy, Sophie T., Hupin, Cloé, Fregimilicka, Chantal, Detry, Bruno R., Bouzin, Caroline, Chevronay, Héloïse Gaide, Lecocq, Marylène, Weynand, Birgit, Ladjemi, Maha Z., Pierreux, Christophe E., Birembaut, Philippe, Polette, Myriam et Pilette, Charles. 2015. « Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition », *European Respiratory Journal*, vol. 45, n° 5, p. 1258-1272.
- GOLD. 2020. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 141.
- Grandel, Ulrich, Heygster, Diana, Sibelius, Ulf, Fink, Ludger, Sigel, Stefanie, Seeger, Werner, Grimminger, Friedrich et Hattar, Katja. 2009. « Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures », *Molecular cancer research: MCR*, vol. 7, n° 10, p. 1729-1735.

- Gu, Wenjing, Hou, Tianhua, Zhou, Hongwei, Zhu, Laiyu, Zhu, Wei et Wang, Yusheng. 2023. « Ferroptosis is involved in PM2.5-induced acute nasal epithelial injury via AMPK-mediated autophagy », *International Immunopharmacology*, vol. 115, p. 109658.
- Gualtieri, M, Ledoux, F, Verdin, A, Billet, S, Martin, P et Courcot, D. 2017. « Particulate Matter Physico-Chemical Characterization and in vitro Toxicological Effects », in *Airbone Particles: Origin, Emissions and Health Impacts*, Kumar, D.P., p. 241-292.
- Gualtieri, Maurizio, Grollino, Maria Giuseppa, Consales, Claudia, Costabile, Francesca, Manigrasso, Maurizio, Avino, Pasquale, Aufderheide, Michaela, Cordelli, Eugenia, Di Liberto, Luca, Petralia, Ettore, Raschellà, Giuseppe, Stracquadanio, Milena, Wiedensohler, Alfred, Pacchierotti, Francesca et Zanini, Gabriele. 2018. « Is it the time to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support the shift of in vitro toxicology from the bench to the field », *Chemosphere*, vol. 207, p. 552-564.
- Gualtieri, Maurizio, Longhin, Eleonora, Mattioli, Michela, Mantecca, Paride, Tinaglia, Valentina, Mangano, Eleonora, Proverbio, Maria Carla, Bestetti, Giuseppina, Camatini, Marina et Battaglia, Cristina. 2012a. « Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5 », *Toxicology Letters*, vol. 209, n° 2, p. 136-145.
- Gualtieri, Maurizio, Longhin, Eleonora, Mattioli, Michela, Mantecca, Paride, Tinaglia, Valentina, Mangano, Eleonora, Proverbio, Maria Carla, Bestetti, Giuseppina, Camatini, Marina et Battaglia, Cristina. 2012b. « Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5 », *Toxicology Letters*, vol. 209, n° 2, p. 136-145.
- Gualtieri, Maurizio, Øvrevik, Johan, Holme, Jørn A., Perrone, M. Grazia, Bolzacchini, Ezio, Schwarze, Per E. et Camatini, Marina. 2010. « Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells », *Toxicology in Vitro*, vol. 24, n° 1, p. 29-39.
- Gualtieri, Maurizio, Øvrevik, Johan, Mollerup, Steen, Asare, Nana, Longhin, Eleonora, Dahlman, Hans-Jørgen, Camatini, Marina et Holme, Jørn A. 2011. « Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 713, n° 1, p. 18-31.
- Guo, Haitao, Callaway, Justin B. et Ting, Jenny P.-Y. 2015. « Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics », *Nature Medicine*, vol. 21, n° 7, p. 677-687.
- Guo, Li, Bai, Shuping, Ding, Shaohua, Zhao, Ling, Xu, Shanqi et Wang, Xiaohong. 2022. « PM2.5 Exposure Induces Lung Injury and Fibrosis by Regulating Ferroptosis via TGF- β Signaling », *Disease Markers*, vol. 2022, p. e7098463.
- Gurczynski, Stephen J. et Moore, Bethany B. 2018. « IL-17 in the lung: the good, the bad, and the ugly », *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 314, n° 1, p. L6-L16.
- Haarmann-Stemmann, Thomas, Abel, Josef, Fritsche, Ellen et Krutmann, Jean. 2012. « The AhR–Nrf2 Pathway in Keratinocytes: On the Road to Chemoprevention? », *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 132, n° 1, p. 7-9.
- Habert, RenĀš, Muczynski, Vincent, Lehraiki, Abdelali, Lambrot, Romain, LĀšcureuil, Charlotte, Levacher, Christine, Coffigny, HervĀš, Pairault, Catherine, Moison, Delphine, Frydman, RenĀš et Rouiller-Fabre, Virginie. 2009. « Adverse effects of endocrine disruptors

Références bibliographiques

on the foetal testis development: focus on the phthalates. », *Folia Histochemica et Cytobiologica*, vol. 47, n° 5, p. 67-74.

Hackett, Tillie-Louise. 2012. « Epithelial–mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma », *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, vol. 12, n° 1, p. 53.

Hackett, Tillie-Louise, Warner, Stephanie Mary, Stefanowicz, Dorota, Shaheen, Furquan, Pechkovsky, Dmitri V., Murray, Lynne A., Argentieri, Rochelle, Kicic, Anthony, Stick, Stephen M., Bai, Tony R. et Knight, Darryl A. 2009. « Induction of epithelial–mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- β 1 », *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 180, n° 2, p. 122-133.

Han, Xiaoyan, Na, Tao, Wu, Tingting et Yuan, Bao-Zhu. 2020. « Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells », *PLOS ONE*, vol. 15, n° 1, p. e0227174.

Hay, Elizabeth D. 2005. « The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it », *Developmental Dynamics*, vol. 233, n° 3, p. 706-720.

Hayes, John D., Dinkova-Kostova, Alben T. et McMahon, Michael. 2009. « Cross-talk between Transcription Factors AhR and Nrf2: Lessons for Cancer Chemoprevention from Dioxin », *Toxicological Sciences*, vol. 111, n° 2, p. 199-201.

Hernandez, J. P., Mota, L. C. et Baldwin, W. S. 2009. « Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation », *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, vol. 7, n° 2, p. 81-105.

Hernández-Pellón, Ana, Fernández-Olmo, Ignacio, Ledoux, Frédéric, Courcot, Lucie et Courcot, Dominique. 2017. « Characterization of manganese-bearing particles in the vicinities of a manganese alloy plant », *Chemosphere*, vol. 175, p. 411-424.

Heßelbach, Katharina, Kim, Gwang-Jin, Flemming, Stephan, Häupl, Thomas, Bonin, Marc, Dornhof, Regina, Günther, Stefan, Merfort, Irmgard et Humar, Matjaz. 2017. « Disease relevant modifications of the methylome and transcriptome by particulate matter (PM_{2.5}) from biomass combustion », *Epigenetics*, vol. 12, n° 9, p. 779-792.

Heyder, Joachim. 2004. « Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery », *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 1, n° 4, p. 315-320.

Hitzenberger, R., Ctyroky, P., Berner, A., Turšič, J., Podkrajšek, B. et Grgić, I. 2006. « Size distribution of black (BC) and total carbon (TC) in Vienna and Ljubljana », *Chemosphere*, vol. 65, n° 11, p. 2106-2113.

Hleis, Dany, Fernández-Olmo, Ignacio, Ledoux, Frédéric, Kfoury, Adib, Courcot, Lucie, Desmonts, Thérèse et Courcot, Dominique. 2013. « Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant », *Journal of Hazardous Materials*, vol. 250-251, p. 246-255.

Hofmann, Werner. 2011. « Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review », *Journal of Aerosol Science*, vol. 42, n° 10, p. 693-724.

Références bibliographiques

- Hogg, James C., Paré, Peter D. et Hackett, Tillie-Louise. 2017. « The contribution of small airway obstruction to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease », *Physiological Reviews*, vol. 97, n° 2, p. 529-552.
- Holownia, A., Wielgat, P., Rysiak, E. et Braszko, J. J. 2016. « Intracellular and Extracellular Cytokines in A549 Cells and THP1 Cells Exposed to Cigarette Smoke », in Pokorski (dir.), *Respiratory Medicine and Science*, Cham : Springer International Publishing, p. 39-45.
- Hori, K., Sen, A. et Artavanis-Tsakonas, S. 2013. « Notch signaling at a glance », *Journal of Cell Science*, vol. 126, n° 10, p. 2135-2140.
- Hotchkiss, Richard S., Strasser, Andreas, McDunn, Jonathan E. et Swanson, Paul E. 2009. « Cell Death », *New England Journal of Medicine*, vol. 361, n° 16, p. 1570-1583.
- Hou, Wei, Hu, Siyi, Li, Chunyan, Ma, Hanbin, Wang, Qi, Meng, Guangping, Guo, Tingting et Zhang, Jie. 2019. « Cigarette smoke induced lung barrier dysfunction, EMT, and tissue remodeling: A possible link between COPD and lung cancer », *BioMed Research International*, vol. 2019, p. 10.
- Huang, Qiansheng, Chi, Yulang, Deng, Junjun, Liu, Yiyao, Lu, Yanyang, Chen, Jinsheng et Dong, Sijun. 2017. « Fine particulate matter 2.5 exerted its toxicological effect by regulating a new layer, long non-coding RNA », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, p. 1-9.
- Huang, Ruby Yun-Ju, Guilford, Parry et Thiery, Jean Paul. 2012. « Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition », *Journal of Cell Science*, vol. 125, n° 19, p. 4417-4422.
- Huang, Weijie, Pang, Yuting, Luo, Xiao-San, Chen, Qi, Wu, Lichun, Tang, Mingwei, Hong, Youwei, Chen, Jinsheng et Jin, Ling. 2020. « The cytotoxicity and genotoxicity of PM2.5 during a snowfall event in different functional areas of a megacity », *Science of The Total Environment*, vol. 741, p. 140267.
- Hukkanen, Janne, Lassila, Arja, Päiväranta, Katja, Valanne, Susanna, Sarpo, Sari, Hakkola, Jukka, Pelkonen, Olavi et Raunio, Hannu. 2000. « Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line », *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 22, n° 3, p. 360-366.
- Hukkanen, Janne, Pelkonen, Olavi, Hakkola, Jukka et Raunio, Hannu. 2002. « Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung », *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 32, n° 5, p. 391-411.
- Hunt, Andrew, Abraham, Jerrold L, Judson, Bret et Berry, Colin L. 2003. « Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. », *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, n° 9, p. 1209-1214.
- Hylkema, M. N., Sterk, P. J., De Boer, W. I. et Postma, D. S. 2007. « Tobacco use in relation to COPD and asthma », *European Respiratory Journal*, vol. 29, n° 3, p. 438-445.
- IARC. 2020. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*, Lyon, 611 : .
- IARC (dir.). 1983. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human*, Lyon : International Agency for Research on Cancer.

Références bibliographiques

Ijaz, Talha, Pazdrak, Konrad, Kalita, Mridul, Konig, Rolf, Choudhary, Sanjeev, Tian, Bing, Boldogh, Istvan et Brasier, Allan R. 2014. « Systems biology approaches to understanding epithelial mesenchymal transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma », *World Allergy Organization Journal*, vol. 7, n° 1, p. 1-14.

Imai, Daisuke, Yoshizumi, Tomoharu, Okano, Shinji, Itoh, Shinji, Ikegami, Toru, Harada, Noboru, Aishima, Shinichi, Oda, Yoshinao et Maehara, Yoshihiko. 2019. « IFN- γ Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and the Expression of PD-L1 in Pancreatic Cancer », *Journal of Surgical Research*, vol. 240, p. 115-123.

INERIS. 2022. *Benzo(g,h,i)pérylène*, Verneuille-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques.

INERIS. 2021. *Indeno(1,2,3-c,d)pyrène*, Verneuille-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques.

INERIS. 2020. *Benzo[b]fluoranthène*, Verneuille-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques.

INSEE. 2017a. « L'économie maritime, portée par les activités complémentaires des trois ports régionaux - Insee Analyses Hauts-de-France - 47 », URL : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2664259>, consulté le 12 octobre 2021.

INSEE. 2017b. « Comparateur de territoire - Intercommunalité-Métropole de Métropole Européenne de Lille (245900410) | Insee », URL : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405599?geo=EPCI-245900410>, consulté le 11 mai 2021.

INSEE. 2015. « Nord-Pas-de-Calais et Picardie : l'influence des grandes aires urbaines », URL : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1285215>, consulté le 12 octobre 2021.

Janssen, Nicole A. H., Yang, Aileen, Strak, Maciej, Steenhof, Maaïke, Hellack, Bryan, Gerlofs-Nijland, Miriam E., Kuhlbusch, Thomas, Kelly, Frank, Harrison, Roy, Brunekreef, Bert, Hoek, Gerard et Cassee, Flemming. 2014. « Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics », *Science of The Total Environment*, vol. 472, p. 572-581.

Jedynska, Aleksandra, Hoek, Gerard, Wang, Meng, Yang, Aileen, Eeftens, Marloes, Cyrus, Josef, Keuken, Menno, Ampe, Christophe, Beelen, Rob, Cesaroni, Giulia, Forastiere, Francesco, Cirach, Marta, Hoogh, Kees de, De Nazelle, Audrey, Nystad, Wenche, Akhlaghi, Helgah Makarem, Declercq, Christophe, Stempfelet, Morgane, Eriksen, Kirsten T., Dimakopoulou, Konstantina, Lanki, Timo, Meliefste, Kees, Nieuwenhuijsen, Mark, Yli-Tuomi, Tarja, Raaschou-Nielsen, Ole, Janssen, Nicole A. H., Brunekreef, Bert et Kooter, Ingeborg M. 2017. « Spatial variations and development of land use regression models of oxidative potential in ten European study areas », *Atmospheric Environment*, vol. 150, p. 24-32.

Jia, Hui, Liu, Yang, Guo, Dan, He, Wei, Zhao, Long et Xia, Shuyue. 2021. « PM2.5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway », *Environmental Toxicology*, vol. 36, n° 3, p. 298-307.

Jiang, Huanhuan, Ahmed, C. M. Sabbir, Zhao, Zixu, Chen, Jin Y., Zhang, Haofei, Canchola, Alexa et Lin, Ying-Hsuan. 2020. « Role of functional groups in reaction kinetics of dithiothreitol with secondary organic aerosols », *Environmental Pollution*, vol. 263, p. 114402.

Jiang, Wei, Pang, Xu-Guang, Wang, Qun, Shen, Ya-Xing, Chen, Xiao-Ke et Xi, Jun-Jie. 2012. « Prognostic role of Twist, Slug, and Foxc2 expression in stage I non-small-cell lung cancer after curative resection », *Clinical Lung Cancer*, vol. 13, n° 4, p. 280-287.

Références bibliographiques

- Jilany Khan, Ghulam, Gao, Yingsheng, Gu, Ming, Wang, Lai, Khan, Sara, Naeem, Farah, Semukunzi, Herve, Roy, Debmalya, Yuan, Shengtao et Sun, Li. 2018. « TGF- β 1 Causes EMT by Regulating N-Acetyl Glucosaminyl Transferases via Downregulation of Non Muscle Myosin II-A through JNK/P38/PI3K Pathway in Lung Cancer », *Current Cancer Drug Targets*, vol. 18, n° 2, p. 209-219.
- Joannes, Audrey, Grelet, Simon, Duca, Laurent, Gilles, Christine, Kileztky, Claire, Dalstein, Véronique, Birembaut, Philippe, Polette, Myriam et Nawrocki-Raby, Béatrice. 2014. « Fhit regulates EMT targets through an EGFR/Src/ERK/Slug signaling axis in human bronchial cells », *Molecular Cancer Research*, vol. 12, n° 5, p. 775-783.
- Jolly, Mohit Kumar, Ward, Chris, Eapen, Mathew Suji, Myers, Stephen, Hallgren, Oskar, Levine, Herbert et Sohal, Sukhwinder Singh. 2018. « Epithelial–mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease », *Developmental Dynamics*, vol. 247, n° 3, p. 346-358.
- Juarez Facio, A. T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevalier, L., Vaugeois, J. -M. et Monteil, C. 2022. « Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface », *Toxicology in Vitro*, vol. 78, p. 105258.
- Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., Roy, F. van, Dargemont, C., Herreros, A. Garcia de, Bellacosa, A. et Larue, L. 2007. « Activation of NF- κ B by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition », *Oncogene*, vol. 26, n° 53, p. 7445-7456.
- Jung, Hae-Yun, Fattet, Laurent et Yang, Jing. 2015. « Molecular pathways: Linking tumor microenvironment to epithelial–mesenchymal transition in metastasis », *Clinical Cancer Research*, vol. 21, n° 5, p. 962-968.
- Kalluri, Raghu et Weinberg, Robert A. 2009. « The basics of epithelial-mesenchymal transition », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, n° 6, p. 1420-1428.
- Kalluri, Raghu et Zeisberg, Michael. 2006. « Fibroblasts in cancer », *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, n° 5, p. 392-401.
- Kasai, Hidenori, Allen, Jeremy T., Mason, Roger M., Kamimura, Takashi et Zhang, Zhi. 2005. « TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT) », *Respiratory Research*, vol. 6, n° 1, p. 56.
- Kawajiri, Kaname et Fujii-Kuriyama, Yoshiaki. 2007. « Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 464, n° 2, p. 207-212.
- Kelly, F. 2003. « Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects », *Occupational and Environmental Medicine*, vol. 60, n° 8, p. 612-616.
- Kelly, Frank J. et Fussell, Julia C. 2012. « Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter », *Atmospheric Environment*, vol. 60, p. 504-526.
- Kfoury, Adib, Ledoux, Frédéric, Roche, Cloé, Delmaire, Gilles, Roussel, Gilles et Courcot, Dominique. 2016. « PM2.5 source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 40, p. 114-128.

Références bibliographiques

- Kim, Hyun-Jung, Litzenger, Beate C., Cui, Xiaojiang, Delgado, David A., Grabner, Brian C., Lin, Xin, Lewis, Michael T., Gottardis, Marco M., Wong, Tai W., Attar, Ricardo M., Carboni, Joan M. et Lee, Adrian V. 2007. « Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and Snail », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, n° 8, p. 3165-3175.
- Knaapen, Ad M., Shi, Tingming, Borm, Paul J. A. et Schins, Roel P. F. 2002. « Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter », *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 234-235, n° 1-2, p. 317-326.
- Kodros, J. K., Volckens, J., Jathar, S. H. et Pierce, J. R. 2018. « Ambient particulate matter size distributions drive regional and global variability in particle deposition in the respiratory tract », *GeoHealth*, vol. 2, n° 10, p. 298-312.
- Kolosova, Irina, Nethery, David et Kern, Jeffrey A. 2011. « Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells », *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, n° 5, p. 1248-1254.
- Kouassi, Kouakou S., Billet, Sylvain, Garçon, Guillaume, Verdin, Anthony, Diouf, Amadou, Cazier, Fabrice, Djaman, Joseph, Courcot, Dominique et Shirali, Pirouz. 2010. « Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire », *Journal of Applied Toxicology*, vol. 30, n° 4, p. 310-320.
- Kretschmer, Xiomara C. et Baldwin, William S. 2005. « CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disrupters? », *Chemico-Biological Interactions*, vol. 155, n° 3, p. 111-128.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. et Melino, G. 2009. « Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 », *Cell Death & Differentiation*, vol. 16, n° 1, p. 3-11.
- Kuniyal, Jagdish Chandra et Guleria, Raj Paul. 2019. « The current state of aerosol-radiation interactions: A mini review », *Journal of Aerosol Science*, vol. 130, p. 45-54.
- Kutlar Joss, Meltem, Eeftens, Marloes, Gintowt, Emily, Kappeler, Ron et Künzli, Nino. 2017. « Time to harmonize national ambient air quality standards », *International Journal of Public Health*, vol. 62, n° 4, p. 453-462.
- Lamouille, Samy, Connolly, Erin, Smyth, James W., Akhurst, Rosemary J. et Derynck, Rik. 2012. « TGF- β -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial–mesenchymal transition and cell invasion », *Journal of Cell Science*, vol. 125, n° 5, p. 1259-1273.
- Lamouille, Samy, Xu, Jian et Derynck, Rik. 2014. « Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, n° 3, p. 178-196.
- Landkocz, Yann, Ledoux, Frédéric, André, Véronique, Cazier, Fabrice, Genevray, Paul, Dewaele, Dorothee, Martin, Perrine J., Lepers, Capucine, Verdin, Anthony, Courcot, Lucie, Boushina, Saâd, Sichel, François, Gualtieri, Maurizio, Shirali, Pirouz, Courcot, Dominique et Billet, Sylvain. 2017. « Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity », *Environmental Pollution*, vol. 221, p. 130-140.

Références bibliographiques

- Laniado-Laborín, Rafael. 2009. « Smoking and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Parallel epidemics of the 21st century », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 6, n° 1, p. 209-224.
- Lau, Alexandria, Villeneuve, Nicole F., Sun, Zheng, Wong, Pak Kin et Zhang, Donna D. 2008. « Dual roles of Nrf2 in cancer », *Pharmacological Research*, vol. 58, n° 5, p. 262-270.
- Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L. Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice, J. -M., Marchetti, P. et Garçon, G. 2018. « Air pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells », *Environmental Pollution*, vol. 243, p. 1434-1449.
- Leclercq, Bérénice, Alleman, Laurent Yves, Perdrix, Esperanza, Riffault, Véronique, Happillon, Mélanie, Strecker, Alain, Lo-Guidice, Jean-Marc, Garçon, Guillaume et Coddeville, Patrice. 2017. « Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: Toxicological perspectives », *Environmental Research*, vol. 156, p. 148-157.
- Ledoux, F., Laversin, H., Courcot, D., Courcot, L., Zhilinskaya, E. A., Puskaric, E. et Aboukais, A. 2006. « Characterization of iron and manganese species in atmospheric aerosols from anthropogenic sources », *Atmospheric Research*, vol. 82, n° 3, p. 622-632.
- Ledoux, Frédéric. 2003. *Les aérosols particulaires atmosphériques sur le Dunkerquois : caractérisations chimiques, physiques, spectroscopiques et évaluation de leur toxicité*, Université du Littoral Côte d'Opale.
- Ledoux, Frédéric, Kfoury, Adib, Delmaire, Gilles, Roussel, Gilles, El Zein, Atallah et Courcot, Dominique. 2017. « Contributions of local and regional anthropogenic sources of metals in PM2.5 at an urban site in northern France », *Chemosphere*, vol. 181, p. 713-724.
- Lee, Hae-Miru, Hwang, Kyung-A et Choi, Kyung-Chul. 2017. « Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 457, p. 103-113.
- Lee, Hee-Ra, Pyo, Min Cheol, Chae, Seung A., Hong, Chung-Oui et Lee, Kwang-Won. 2019. « Inhibitory effect of chebulic acid on alveolar epithelial to mesenchymal transition in response to urban particulate matter using co-treatment and post-treatment exposure », *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 42, n° 8, p. 1322-1331.
- Lee, Tae-Hee et Kang, Tae-Hong. 2019. « DNA Oxidation and Excision Repair Pathways », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 23, p. 6092.
- Leikauf, George D., Kim, Sang-Heon et Jang, An-Soo. 2020. « Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects », *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 52, n° 3, p. 329-337.
- Lelieveld, J., Evans, J. S., Fnais, M., Giannadaki, D. et Pozzer, A. 2015. « The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale », *Nature*, vol. 525, n° 7569, p. 367-371.
- Lelieveld, Jos, Pozzer, Andrea, Pöschl, Ulrich, Fnais, Mohammed, Haines, Andy et Münzel, Thomas. 2020. « Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective », *Cardiovascular Research*.

Références bibliographiques

Lepers, Capucine, André, Véronique, Dergham, Mona, Billet, Sylvain, Verdin, Anthony, Garçon, Guillaume, Dewaele, Dorothee, Cazier, Fabrice, Sichel, François et Shirali, Pirouz. 2014. « Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA adducts generated by particulate matter pollution in BEAS-2B cell line: geographical and seasonal influence », *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, n° 6, p. 703-713.

Lepeule, Johanna, Laden, Francine, Dockery, Douglas et Schwartz, Joel. 2012. « Chronic exposure to fine particles and mortality: An extended follow-up of the Harvard six cities study from 1974 to 2009 », *Environmental Health Perspectives*, vol. 120, n° 7, p. 965-970.

Lesage, Julien, Suarez-Carmona, Meggy, Neyrinck-Leglantier, Deborah, Grelet, Simon, Blacher, Silvia, Hunziker, Walter, Birembaut, Philippe, Noël, Agnes, Nawrocki-Raby, Béatrice, Gilles, Christine et Polette, Myriam. 2017. « Zonula occludens-1/NF- κ B/CXCL8: a new regulatory axis for tumor angiogenesis », *The FASEB Journal*, vol. 31, n° 4, p. 1678-1688.

Li, Jie, Cao, Feng, Yin, He-liang, Huang, Zi-jian, Lin, Zhi-tao, Mao, Ning, Sun, Bei et Wang, Gang. 2020. « Ferroptosis: past, present and future », *Cell Death & Disease*, vol. 11, n° 2, p. 1-13.

Li, Lingmei, Qi, Lisha, Liang, Zhijie, Song, Wangzhao, Liu, Yanxue, Wang, Yalei, Sun, Baocun, Zhang, Bin et Cao, Wenfeng. 2015. « Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells », *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 36, n° 1, p. 113-122.

Líbalová, Helena, Krčková, Simona, Uhlířová, Kateřina, Kléma, Jiří, Ciganek, Miroslav, Rössner, Pavel, Šrám, Radim J., Vondráček, Jan, Machala, Miroslav et Topinka, Jan. 2014. « Analysis of gene expression changes in A549 cells induced by organic compounds from respirable air particles », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 770, p. 94-105.

Libalova, Helena, Milcova, Alena, Cervena, Tereza, Vrbova, Kristyna, Rossnerova, Andrea, Novakova, Zuzana, Topinka, Jan et Rossner, Pavel. 2018. « Kinetics of ROS generation induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and organic extracts from ambient air particulate matter in model human lung cell lines », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 827, p. 50-58.

Lin, Manfei et Yu, Jian Zhen. 2019. « Effect of metal-organic interactions on the oxidative potential of mixtures of atmospheric humic-like substances and copper/manganese as investigated by the dithiothreitol assay », *Science of The Total Environment*, vol. 697, p. 134012.

Litwiniec, Anna, Gackowska, Lidia, Helmin-Basa, Anna, Żuryń, Agnieszka et Grzanka, Alina. 2013. « Low-dose etoposide-treatment induces endoreplication and cell death accompanied by cytoskeletal alterations in A549 cells: Does the response involve senescence? The possible role of vimentin », *Cancer Cell International*, vol. 13, p. 9.

Liu, Ting, Zhang, Lingyun, Joo, Donghyun et Sun, Shao-Cong. 2017. « NF- κ B signaling in inflammation », *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 2, n° 1, p. 1-9.

Livak, Kenneth J. et Schmittgen, Thomas D. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method », *Methods*, vol. 25, n° 4, p. 402-408.

Lo Re, Sandra, Dumoutier, Laure, Couillin, Isabelle, Van Vyve, Charlotte, Yakoub, Yousof, Uwambayinema, Francine, Marien, Benoît, Brûle, Sybille van den, Van Snick, Jacques,

- Uyttenhove, Catherine, Ryffel, Bernard, Renauld, Jean-Christophe, Lison, Dominique et Huaux, François. 2010. « IL-17A–Producing $\gamma\delta$ T and Th17 Lymphocytes Mediate Lung Inflammation but Not Fibrosis in Experimental Silicosis », *The Journal of Immunology*, vol. 184, n° 11, p. 6367-6377.
- Loffredo, L. F., Abdala-Valencia, H., Anekalla, K. R., Cuervo-Pardo, L., Gottardi, C. J. et Berdnikovs, S. 2017. « Beyond epithelial-to-mesenchymal transition: Common suppression of differentiation programs underlies epithelial barrier dysfunction in mild, moderate, and severe asthma », *Allergy*, vol. 72, n° 12, p. 1988-2004.
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J. A., Franzetti, A., Camatini, M. et Gualtieri, M. 2013. « Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells », *Toxicology in Vitro*, vol. 27, n° 2, p. 551-559.
- Longhin, Eleonora, Camatini, Marina, Bersaas, Audun, Mantecca, Paride et Mollerup, Steen. 2018. « The role of SerpinB2 in human bronchial epithelial cells responses to particulate matter exposure », *Archives of Toxicology*, vol. 92, n° 9, p. 2923-2933.
- Longhin, Eleonora, Capasso, Laura, Battaglia, Cristina, Proverbio, Maria Carla, Cosentino, Cristina, Cifola, Ingrid, Mangano, Eleonora, Camatini, Marina et Gualtieri, Maurizio. 2016. « Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter », *Environmental Pollution*, vol. 209, p. 87-98.
- Longhin, Eleonora, Gualtieri, Maurizio, Capasso, Laura, Bengalli, Rossella, Mollerup, Steen, Holme, Jørn A., Øvrevik, Johan, Casadei, Simone, Di Benedetto, Cristiano, Parenti, Paolo et Camatini, Marina. 2016. « Physico-chemical properties and biological effects of diesel and biomass particles », *Environmental Pollution*, vol. 215, p. 366-375.
- Longhin, Eleonora Marta, Mantecca, Paride et Gualtieri, Maurizio. 2020. « Fifteen years of airborne particulates in vitro toxicology in Milano: Lessons and perspectives learned », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n° 7, p. 2489.
- Loomis, Dana, Grosse, Yann, Lauby-Secretan, Béatrice, El Ghissassi, Fatima, Bouvard, Véronique, Benbrahim-Tallaa, Lamia, Guha, Neela, Baan, Robert, Mattock, Heidi, Straif, Kurt, et International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. 2013. « The carcinogenicity of outdoor air pollution », *The Lancet. Oncology*, vol. 14, n° 13, p. 1262-1263.
- Lu, Shaoyou, Yang, Dongfeng, Ge, Xiang, Li, Le, Zhao, Yang, Li, Chun, Ma, Shengtao et Yu, Yingxin. 2020. « The internal exposure of phthalate metabolites and bisphenols in waste incineration plant workers and the associated health risks », *Environment International*, vol. 145, p. 106101.
- Lu, Shelly C. 2013. « Glutathione synthesis », *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1830, n° 5, p. 3143-3153.
- Luo, Fei, Wei, Hongying, Guo, Huaqi, Li, Yan, Feng, Yan, Bian, Qian et Wang, Yan. 2019. « LncRNA MALAT1, an lncRNA acting via the miR-204/ZEB1 pathway, mediates the EMT induced by organic extract of PM2.5 in lung bronchial epithelial cells », *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 317, n° 1, p. L87-L98.
- Ma, Jing, Chen, Liu-lu, Guo, Ying, Wu, Qian, Yang, Ming, Wu, Ming-hong et Kannan, Kurunthachalam. 2014. « Phthalate diesters in Airborne PM2.5 and PM10 in a suburban area of Shanghai: Seasonal distribution and risk assessment », *Science of The Total Environment*, vol. 497-498, p. 467-474.

Références bibliographiques

Ma, Qin-Yun, Huang, Da-Yu, Zhang, Hui-Jun, Wang, Shaohua et Chen, Xiao-Feng. 2017. « Exposure to particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity », *International Immunopharmacology*, vol. 50, p. 139-145.

Ma, Yiqiu, Cheng, Yubo, Qiu, Xinghua, Cao, Gang, Fang, Yanhua, Wang, Junxia, Zhu, Tong, Yu, Jianzhen et Hu, Di. 2018. « Sources and oxidative potential of water-soluble humic-like substances (HULIS_{WS}) in fine particulate matter (PM_{2.5}) in Beijing », *Atmospheric Chemistry and Physics*, vol. 18, n° 8, p. 5607-5617.

Manore, Sara G., Doheny, Daniel L., Wong, Grace L. et Lo, Hui-Wen. 2022. « IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment », *Frontiers in Oncology*, vol. 12, p. 866014.

Manshour, Roxsan, Coyaud, Etienne, Kundu, Samrat T., Peng, David H., Stratton, Sabrina A., Alton, Kendra, Bajaj, Rakhee, Fradette, Jared J., Minelli, Rosalba, Peoples, Michael D., Carugo, Alessandro, Chen, Fengju, Bristow, Christopher, Kovacs, Jeffrey J., Barton, Michelle C., Heffernan, Tim, Creighton, Chad J., Raught, Brian et Gibbons, Don L. 2019. « ZEB1/NuRD complex suppresses TBC1D2b to stimulate E-cadherin internalization and promote metastasis in lung cancer », *Nature Communications*, vol. 10, n° 1, p. 1-15.

Manzano, -León Natalia, Serrano, -Lomelin Jesús, S, áncchez Brisa N., Quintana, -Belmares Raúl, Vega, Elizabeth, V, ázquez-López Inés, Rojas, -Bracho Leonora, L, ópez-Villegas Maria Tania, Vadillo, -Ortega Felipe, De, Vizcaya-Ruiz Andrea, Perez, Irma Rosas, O, 'Neill Marie S. et Osornio, -Vargas Alvaro R. 2016. « TNF α and IL-6 Responses to Particulate Matter in Vitro: Variation According to PM Size, Season, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and Soil Content », *Environmental Health Perspectives*, vol. 124, n° 4, p. 406-412.

Margaron, Yoran, Nagai, Tomoaki, Guyon, Laurent, Kurzawa, Laetitia, Morel, Anne-Pierre, Pinheiro, Alice, Blanchoin, Laurent, Rey, Fabien, Puisieux, Alain et Théry, Manuel. 2019. « Biophysical properties of intermediate states of EMT outperform both epithelial and mesenchymal states », *bioRxiv*, p. 797654.

Martonen, T. B., Yang, Y. et Xue, Z. Q. 1994. « Effects of carinal ridge shapes on lung airstreams », *Aerosol Science and Technology*, vol. 21, n° 2, p. 119-136.

Martonen, T.b. 1992. « Deposition patterns of cigarette smoke in human airways », *American Industrial Hygiene Association Journal*, vol. 53, n° 1, p. 6-18.

Méausoone, Clémence, Landkocz, Yann, Cazier, Fabrice, Seigneur, Marianne, Courcot, Dominique et Billet, Sylvain. 2021. « Toxicological responses of BEAS-2B cells to repeated exposures to benzene, toluene, m-xylene, and mesitylene using air-liquid interface method », *Journal of Applied Toxicology*, vol. 41, n° 8, p. 1262-1274.

Meister, Alton et Anderson, Mary E. 1983. « Glutathione », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 52, n° 1, p. 711-760.

Melki, Pamela N., Ledoux, Frédéric, Aouad, Samer, Billet, Sylvain, El Khoury, Bilal, Landkocz, Yann, Abdel-Massih, Roula M. et Courcot, Dominique. 2017. « Physicochemical characteristics, mutagenicity and genotoxicity of airborne particles under industrial and rural influences in Northern Lebanon », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, n° 23, p. 18782-18797.

- Merikallio, Heta, Turpeenniemi-Hujanen, Taina, Pääkkö, Paavo, Mäkitaro, Riitta, Riitta, Kaarteenaho, Salo, Sirpa, Salo, Tuula, Harju, Terttu et Soini, Ylermi. 2012. « Snail promotes an invasive phenotype in lung carcinoma », *Respiratory Research*, vol. 13, n° 1, p. 104.
- Merk, Regina, Heßelbach, Katharina, Osipova, Anastasiya, Popadić, Désirée, Schmidt-Heck, Wolfgang, Kim, Gwang-Jin, Günther, Stefan, Piñeres, Alfonso García, Merfort, Irmgard et Humar, Matjaz. 2020. « Particulate Matter (PM2.5) from Biomass Combustion Induces an Anti-Oxidative Response and Cancer Drug Resistance in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, n° 21, p. 8193.
- Metzger, Kristi Busico, Tolbert, Paige E., Klein, Mitchel, Peel, Jennifer L., Flanders, W. Dana, Todd, Knox, Mulholland, James A., Ryan, P. Barry et Frumkin, Howard. 2004. « Ambient air pollution and cardiovascular emergency department visits », *Epidemiology*, vol. 15, n° 1, p. 46-56.
- Meyer, Ralf Peter, Podvinec, Michael et Meyer, Urs A. 2002. « Cytochrome P450 CYP1A1 Accumulates in the Cytosol of Kidney and Brain and Is Activated by Heme », *Molecular Pharmacology*, vol. 62, n° 5, p. 1061-1067.
- Michael, S., Montag, M. et Dott, W. 2013. « Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter », *Environmental Pollution*, vol. 183, p. 19-29.
- Milano, Annalisa, Mazzetta, Francesca, Valente, Sabatino, Ranieri, Danilo, Leone, Laura, Botticelli, Andrea, Onesti, Concetta Elisa, Lauro, Salvatore, Raffa, Salvatore, Torrisi, Maria Rosaria et Marchetti, Paolo. 2018. « Molecular detection of EMT markers in circulating tumor cells from metastatic non-small cell lung cancer patients: Potential role in clinical practice », *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, 2018:3506874.
- Mimura, Junsei et Fujii-Kuriyama, Yoshiaki. 2003. « Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1619, n° 3, p. 263-268.
- Mirończuk-Chodakowska, Iwona, Witkowska, Anna Maria et Zujko, Małgorzata Elżbieta. 2018. « Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body », *Advances in Medical Sciences*, vol. 63, n° 1, p. 68-78.
- Mitrano, Denise M., Wick, Peter et Nowack, Bernd. 2021. « Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution », *Nature Nanotechnology*, vol. 16, n° 5, p. 491-500.
- Mittal, Vivek. 2016. « Epithelial mesenchymal transition in aggressive lung cancers », *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 890, p. 37-56.
- Møller, Ian M., Rogowska-Wrzesinska, Adelina et Rao, R. S. P. 2011. « Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective », *Journal of Proteomics*, vol. 74, n° 11, p. 2228-2242.
- Monaci, F. et Bargagli, R. 1997. « Barium and Other Trace Metals as Indicators of Vehicle Emissions », *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 100, n° 1, p. 89-98.
- Moufarrej, Lamia, Courcot, Dominique et Ledoux, Frédérique. 2020. « Assessment of the PM2.5 oxidative potential in a coastal industrial city in Northern France: Relationships with chemical composition, local emissions and long range sources », *Science of The Total Environment*, vol. 748, p. 141448.

Références bibliographiques

Murray, Lynne A., Dunmore, Rebecca, Camelo, Ana, Da Silva, Carla A., Gustavsson, Malin J., Habel, David M., Hackett, Tillie L., Hogaboam, Cory M., Sleeman, Matthew A. et Knight, Darryl A. 2017. « Acute cigarette smoke exposure activates apoptotic and inflammatory programs but a second stimulus is required to induce epithelial to mesenchymal transition in COPD epithelium », *Respiratory Research*, vol. 18, n° 1, p. 82.

Nalluri, Sandeep M., O'Connor, Joseph W. et Gomez, Esther W. 2015. « Cytoskeletal signaling in TGF β -induced epithelial–mesenchymal transition », *Cytoskeleton*, vol. 72, n° 11, p. 557-569.

Nawijn, Martijn C., Hackett, Tillie L., Postma, Dirkje S., Oosterhout, Antoon J. M. van et Heijink, Irene H. 2011. « E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization », *Trends in Immunology*, vol. 32, n° 6, p. 248-255.

Nawshad, Ali, Medici, Damian, Liu, Chang-Chih et Hay, Elizabeth D. 2007. « TGF β 3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex », *Journal of Cell Science*, vol. 120, n° 9, p. 1646-1653.

Nguyen, Truyen, Nioi, Paul et Pickett, Cecil B. 2009. « The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress », *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, n° 20, p. 13291-13295.

Ni, Lei, Chuang, Chia-Chen et Zuo, Li. 2015. « Fine particulate matter in acute exacerbation of COPD », *Frontiers in Physiology*, vol. 6, n° 294.

Nieto, M. Angela, Huang, Ruby Yun-Ju, Jackson, Rebecca A. et Thiery, Jean Paul. 2016. « EMT: 2016 », *Cell*, vol. 166, n° 1, p. 21-45.

Niki, Etsuo, Yoshida, Yasukazu, Saito, Yoshiro et Noguchi, Noriko. 2005. « Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, n° 1, p. 668-676.

Nisbet, Ian C. T. et LaGoy, Peter K. 1992. « Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 16, n° 3, p. 290-300.

Nowrin, Kaosia, Sohal, Sukhwinder Singh, Peterson, Gregory, Patel, Rahul et Walters, Eugene Haydn. 2014. « Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer », *Expert Review of Respiratory Medicine*, vol. 8, n° 5, p. 547-559.

Oh, Seung Min, Kim, Ha Ryong, Park, Yong Joo, Lee, Soo Yeun et Chung, Kyu Hyuck. 2011. « Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 723, n° 2, p. 142-151.

Okada, Tomoyo, Sinha, Surajit, Esposito, Ilaria, Schiavon, Gaia, López-Lago, Miguel A., Su, Wenjing, Pratilas, Christine A., Abele, Cristina, Hernandez, Jonathan M., Ohara, Masahiro, Okada, Morihito, Viale, Agnes, Heguy, Adriana, Socci, Nicholas D., Sapino, Anna, Seshan, Venkatraman E., Long, Stephen, Inghirami, Giorgio, Rosen, Neal et Giancotti, Filippo G. 2015. « The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling », *Nature Cell Biology*, vol. 17, n° 1, p. 81-94.

Øvrevik, Johan. 2019. « Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 19, p. 4772.

Owen, Joshua B. et Butterfield, D. Allan. 2010. « Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio », in Bross et Gregersen (dir.), *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging: Concepts and Protocols*, Totowa, NJ : Humana Press, p. 269-277.

Øya, Elisabeth, Becher, Rune, Ekeren, Leni, Afanou, Anani K. J., Øvrevik, Johan et Holme, Jørn A. 2019. « Pro-inflammatory responses in human bronchial epithelial cells induced by spores and hyphal fragments of common damp indoor molds », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 16, n° 6, p. 1085.

Paatero, Pentti et Tapper, Unto. 1994. « Positive matrix factorization: A non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values », *Environmetrics*, vol. 5, n° 2, p. 111-126.

Pain, Mallory, Bermudez, Olga, Lacoste, Philippe, Royer, Pierre-Joseph, Botturi, Karine, Tissot, Adrien, Brouard, Sophie, Eickelberg, Oliver et Magnan, Antoine. 2014. « Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype », *European Respiratory Review*, vol. 23, n° 131, p. 118-130.

Pang, Yuting, Huang, Weijie, Luo, Xiao-San, Chen, Qi, Zhao, Zhen, Tang, Mingwei, Hong, Youwei, Chen, Jinsheng et Li, Hongbo. 2020. « In-vitro human lung cell injuries induced by urban PM2.5 during a severe air pollution episode: Variations associated with particle components », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 206, p. 111406.

Park, Hee Sun, Kim, So Ri et Lee, Yong Chul. 2009. « Impact of oxidative stress on lung diseases », *Respirology*, vol. 14, n° 1, p. 27-38.

Park, Minhan, Joo, Hung Soo, Lee, Kwangyul, Jang, Myoseon, Kim, Sang Don, Kim, Injeong, Borlaza, Lucille Joanna S., Lim, Heungbin, Shin, Hanjae, Chung, Kyu Hyuck, Choi, Yoon-Hyeong, Park, Sun Gu, Bae, Min-Suk, Lee, Jiyi, Song, Hangyul et Park, Kihong. 2018. « Differential toxicities of fine particulate matters from various sources », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, p. 1-11.

Park, Youn-hee, Kim, Donghern, Dai, Jin et Zhang, Zhuo. 2015. « Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study heavy metals induced carcinogenesis », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 287, n° 3, p. 240-245.

Patel, Ami, Sabbineni, Harika, Clarke, Andrea et Somanath, Payaningal R. 2016. « Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis », *Life Sciences*, vol. 157, p. 52-61.

Peel, Jennifer L., Tolbert, Paige E., Klein, Mitchel, Metzger, Kristi Busico, Flanders, W. Dana, Todd, Knox, Mulholland, James A., Ryan, P. Barry et Frumkin, Howard. 2005. « Ambient air pollution and respiratory emergency department visits », *Epidemiology*, vol. 16, n° 2, p. 164-174.

Peixoto, Milena Simões, Oliveira Galvão, Marcos Felipe de et Batistuzzo de Medeiros, Silvia Regina. 2017. « Cell death pathways of particulate matter toxicity », *Chemosphere*, vol. 188, p. 32-48.

Peng, Kun-Jing, Wang, Jin-Huan, Su, Wei-Ting, Wang, Xi-Cai, Yang, Feng-Tang et Nie, Wen-Hui. 2010. « Characterization of two human lung adenocarcinoma cell lines by reciprocal

Références bibliographiques

chromosome painting », *Dong Wu Xue Yan Jiu = Zoological Research*, vol. 31, n° 2, p. 113-121.

Pernigotti, Denise, Belis, Claudio A. et Spanò, Luca. 2016. « SPECIEUROPE: The European data base for PM source profiles », *Atmospheric Pollution Research*, vol. 7, n° 2, p. 307-314.

Perrone, Maria Grazia, Gualtieri, Maurizio, Ferrero, Luca, Porto, Claudia Lo, Udisti, Roberto, Bolzacchini, Ezio et Camatini, Marina. 2010. « Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan », *Chemosphere*, vol. 78, n° 11, p. 1368-1377.

Petry, Thomas, Schmid, Peter et Schlatter, Christian. 1996. « The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) », *Chemosphere*, vol. 32, n° 4, p. 639-648.

Pietrogrande, Maria Chiara, Dalpiaz, Cristina, Dell'Anna, Rossana, Lazzeri, Paolo, Manarini, Francesco, Visentin, Marco et Tonidandel, Gabriele. 2018. « Chemical composition and oxidative potential of atmospheric coarse particles at an industrial and urban background site in the alpine region of northern Italy », *Atmospheric Environment*, vol. 191, p. 340-350.

Platel, A., Privat, K., Talahari, S., Delobel, A., Dourdin, G., Gateau, E., Simar, S., Saleh, Y., Sotty, J., Antherieu, S., Canivet, L., Alleman, L. -Y., Perdrix, E., Garçon, G., Denayer, F. O., Lo Guidice, J. M. et Nesslany, F. 2020. « Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) particles on lung models », *Science of The Total Environment*, vol. 711, p. 134666.

Plummer, Laurel E., Ham, Walter, Kleeman, Michael J., Wexler, Anthony et Pinkerton, Kent E. 2012. « Influence of season and location on pulmonary response to California's San Joaquin Valley airborne particulate matter », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 75, n° 5, p. 253-271.

Polette, Myriam, Mestdagt, Mélanie, Bindels, Sandrine, Nawrocki-Raby, Béatrice, Hunziker, Walter, Foidart, Jean-Michel, Birembaut, Philippe et Gilles, Christine. 2007. « β -Catenin and ZO-1: Shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes », *Cells Tissues Organs*, vol. 185, n° 1-3, p. 61-65.

Polette, Myriam, Nawrocki-Raby, Béatrice, Gilles, Christine, Clavel, Christine et Birembaut, Philippe. 2004. « Tumour invasion and matrix metalloproteinases », *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 49, n° 3, p. 179-186.

Pope, C. Arden III, Burnett, Richard T., Thun, Michael J., Calle, Eugenia E., Krewski, Daniel, Ito, Kazuhiko et Thurston, George D. 2002. « Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution », *Journal of American Medical Association*, vol. 287, n° 9, p. 1132-1141.

Pozzi, Roberta, De Berardis, Barbara, Paoletti, Luigi et Guastadisegni, Cecilia. 2003. « Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells », *Toxicology*, vol. 183, n° 1, p. 243-254.

Puisieux, Alain, Brabletz, Thomas et Caramel, Julie. 2014. « Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors », *Nature Cell Biology*, vol. 16, n° 6, p. 488-494.

Puisney, Chloé, Oikonomou, Evdokia K., Nowak, Sophie, Chevillot, Alexandre, Casale, Sandra, Baeza-Squiban, Armelle et Berret, Jean-François. 2018. « Brake wear (nano)particle

characterization and toxicity on airway epithelial cells in vitro », *Environmental Science: Nano*, vol. 5, n° 4, p. 1036-1044.

Rakkestad, Eline Kirsten, Dye, Jarle Christian, Yttri, Karl Espen, Holme, Jørn Andreas, Hongslo, Jan Kenneth, Schwarze, Per Everhard et Becher, Rune. 2007. « Phthalate levels in Norwegian indoor air related to particle size fraction », *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 9, n° 12, p. 1419-1425.

Relja, B., Omid, N., Konradowitz, K., Jurida, K., Oppermann, E., Störmann, P., Werner, I., Juengel, E., Seebach, C. et Marzi, I. 2014. « Decreased Inflammatory Responses of Human Lung Epithelial Cells after Ethanol Exposure Are Mimicked by Ethyl Pyruvate », *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, p. e781519.

Reyes-Reyes, Elsa M., Aispuro, Ivan, Tavera-Garcia, Marco A., Field, Matthew, Moore, Sara, Ramos, Irma et Ramos, Kenneth S. 2017. « LINE-1 couples EMT programming with acquisition of oncogenic phenotypes in human bronchial epithelial cells », *Oncotarget*, vol. 8, n° 61, p. 103828-103842.

Reyes-Reyes, Elsa M, Ramos, Irma N, Tavera-Garcia, Marco A et Ramos, Kenneth S. 2016. « The aryl hydrocarbon receptor agonist benzo(a)pyrene reactivates LINE-1 in HepG2 cells through canonical TGF- β 1 signaling: implications in hepatocellular carcinogenesis », *American Journal of Cancer Research*, vol. 6, n° 5, p. 1066-1077.

Rico-Leo, Eva M., Alvarez-Barrientos, Alberto et Fernandez-Salguero, Pedro M. 2013. « Dioxin receptor expression inhibits basal and transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, n° 11, p. 7841-7856.

Riffault, Véronique, Arndt, Jovanna, Marris, Hélène, Mbengue, Saliou, Setyan, Ari, Alleman, Laurent Y., Deboudt, Karine, Flament, Pascal, Augustin, Patrick, Delbarre, Hervé et Wenger, John. 2015. « Fine and Ultrafine Particles in the Vicinity of Industrial Activities: A Review », *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 45, n° 21, p. 2305-2356.

Roche, Cloé. 2019. *Étude des concentrations et de la composition des PM_{2.5} sur le littoral du Nord de la France : Evaluation des contributions maritimes de l'espace Manche - Mer du Nord*, Université du Littoral Côte d'Opale.

Roh, Yoon Jin, Noh, Hyun Ha, Koo, Na Yeon, Shin, Sun Hye, Lee, Mi-Kyung, Park, Kui Young et Seo, Seong Jun. 2022. « Development of In Vitro Co-Culture Model to Mimic the Cell to Cell Communication in Response to Urban PM_{2.5} », *Annals of Dermatology*, vol. 34, n° 2, p. 110-117.

Rolph, Catherine A., Gwyther, Ceri L., Tyrrel, Sean F., Nasir, Zaheer A., Drew, Gillian H., Jackson, Simon K., Khera, Shagun, Hayes, Enda T., Williams, Ben, Bennett, Allan, Collins, Samuel, Walsh, Kerry, Kinnersley, Rob et Gladding, Toni L. 2018. « Sources of Airborne Endotoxins in Ambient Air and Exposure of Nearby Communities—A Review », *Atmosphere*, vol. 9, n° 10, p. 375.

Rönkkö, Teemu J., Jalava, Pasi I., Happonen, Mikko S., Kasurinen, Stefanie, Sippula, Olli, Leskinen, Ari, Koponen, Hanna, Kuusipalo, Kari, Ruusunen, Jarno, Väisänen, Olli, Hao, Liqing, Ruuskanen, Antti, Orasche, Jürgen, Fang, Die, Zhang, Lei, Lehtinen, Kari E. J., Zhao, Yu, Gu, Cheng, Wang, Qin'geng, Jokiniemi, Jorma, Komppula, Mika et Hirvonen, Maija-Riitta. 2018. « Emissions and atmospheric processes influence the chemical composition and toxicological properties of urban air particulate matter in Nanjing, China », *Science of The Total Environment*, vol. 639, p. 1290-1310.

Références bibliographiques

Ross, David et Siegel, David. 2021. « The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control », *Redox Biology*, vol. 41, p. 101950.

Ross, David et Siegel, David. 2018. « NQO1 in protection against oxidative stress », *Current Opinion in Toxicology*, vol. 7, p. 67-72.

Ross, David et Siegel, David. 2017. « Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch », *Frontiers in Physiology*, vol. 8.

Royce, Simon G., Tan, Liling, Koek, Alicia A. et Tang, Mimi L. K. 2009. « Effect of extracellular matrix composition on airway epithelial cell and fibroblast structure: Implications for airway remodeling in asthma », *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 102, n° 3, p. 238-246.

Růžičková, Jana, Raclavská, Helena, Raclavský, Konstantin et Juchelková, Dagmar. 2016. « Phthalates in PM2.5 airborne particles in the Moravian-Silesian Region, Czech Republic », *Perspectives in Science*, vol. 7, p. 178-183.

Rynning, Iselin, Neca, Jiri, Vrbova, Kristyna, Libalova, Helena, Rossner, Pavel, Holme, Jørn A., Gützkow, Kristine B., Afanou, Anani K. Johnny, Arnoldussen, Yke J., Hrubá, Eva, Skare, Øivind, Haugen, Aage, Topinka, Jan, Machala, Miroslav et Møllerup, Steen. 2018. « In vitro transformation of human bronchial epithelial cells by diesel exhaust particles: Gene expression profiling and early toxic responses », *Toxicological Sciences*, vol. 166, n° 1, p. 51-64.

Sakai, Mitsuaki, Sato, Yukio, Sato, Shoko, Ihara, Satoshi, Onizuka, Masataka, Sakakibara, Yuzuru et Takahashi, Hideto. 2004. « Effect of relocating to areas of reduced atmospheric particulate matter levels on the human circulating leukocyte count », *Journal of Applied Physiology*, vol. 97, n° 5, p. 1774-1780.

Salameh, D., Pey, J., Bozzetti, C., El Haddad, I., Detournay, A., Sylvestre, A., Canonaco, F., Armengaud, A., Piga, D., Robin, D., Prevot, A. S. H., Jaffrezo, J. -L., Wortham, H. et Marchand, N. 2018. « Sources of PM2.5 at an urban-industrial Mediterranean city, Marseille (France): Application of the ME-2 solver to inorganic and organic markers », *Atmospheric Research*, vol. 214, p. 263-274.

Salgueiro-González, N., López de Alda, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. et Barceló, Damià. 2015. « Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 66, p. 45-52.

Salgueiro-González, N., López de Alda, M., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. et Barceló, Damià. 2013. « Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, n° 27, p. 8913-8923.

Samet, James M., Chen, Hao, Pennington, Edward R. et Bromberg, Philip A. 2019. « Non-redox cycling mechanisms of oxidative stress induced by PM metals », *Free Radical Biology and Medicine*.

Sánchez-Ortega, Miriam, Carrera, Ana Clara et Garrido, Antonio. 2021. « Role of NRF2 in Lung Cancer », *Cells*, vol. 10, n° 8, p. 1879.

Santibáñez-Andrade, Miguel, Chirino, Yolanda I., González-Ramírez, Imelda, Sánchez-Pérez, Yesennia et García-Cuellar, Claudia M. 2020. « Deciphering the Code between Air Pollution

and Disease: The Effect of Particulate Matter on Cancer Hallmarks », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n° 1, p. 136.

Schins, Roel P. F, Lightbody, Janet H, Borm, Paul J. A, Shi, Tingming, Donaldson, Ken et Stone, Vicki. 2004. « Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 195, n° 1, p. 1-11.

Seinfeld, John H. et Pandis, Spyros N. 2006. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*Wiley.

Senga, Takeshi, Hasegawa, Hitoki, Tanaka, Miwa, Rahman, Mohammad Aminur, Ito, Satoko et Hamaguchi, Michinari. 2008. « The cysteine-cluster motif of c-Src: Its role for the heavy metal-mediated activation of kinase », *Cancer Science*, vol. 99, n° 3, p. 571-575.

Shang, Yu, Wu, Meiyang, Zhou, Jizhi, Zhang, Xing, Zhong, Yufang, An, Jing et Qian, Guangren. 2019. « Cytotoxicity comparison between fine particles emitted from the combustion of municipal solid waste and biomass », *Journal of Hazardous Materials*, vol. 367, p. 316-324.

Shi, Jian-Hong et Sun, Shao-Cong. 2018. « Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways », *Frontiers in Immunology*, vol. 9.

Shimobaba, Shun, Taga, Saeko, Akizuki, Risa, Hichino, Asami, Endo, Satoshi, Matsunaga, Toshiyuki, Watanabe, Ryo, Yamaguchi, Masahiko, Yamazaki, Yasuhiro, Sugatani, Junko et Ikari, Akira. 2016. « Claudin-18 inhibits cell proliferation and motility mediated by inhibition of phosphorylation of PDK1 and Akt in human lung adenocarcinoma A549 cells », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1863, n° 6, Part A, p. 1170-1178.

Shivanna, Binoy, Chu, Chun et Moorthy, Bhagavatula. 2022. « The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): A Novel Therapeutic Target for Pulmonary Diseases? », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, n° 3, p. 1516.

Sies, Helmut, Berndt, Carsten et Jones, Dean P. 2017. « Oxidative Stress », *Annual Review of Biochemistry*, vol. 86, n° 1, p. 715-748.

Simoneit, B. R. T., Schauer, J. J., Nolte, C. G., Oros, D. R., Elias, V. O., Fraser, M. P., Rogge, W. F. et Cass, G. R. 1999. « Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles », *Atmospheric Environment*, vol. 33, n° 2, p. 173-182.

Sippula, Olli, Hytönen, Kati, Tissari, Jarkko, Raunemaa, Taisto et Jokiniemi, Jorma. 2007. « Effect of Wood Fuel on the Emissions from a Top-Feed Pellet Stove », *Energy & Fuels*, vol. 21, n° 2, p. 1151-1160.

Sohal, Sukhwinder S., Reid, David, Soltani, Amir, Ward, Chris, Weston, Steven, Muller, H. Konrad, Wood-Baker, Richard et Walters, E. Haydn. 2011. « Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease », *Respiratory Research*, vol. 12, n° 1, p. 130.

Sohal, Sukhwinder Singh, Mahmood, Malik Quasir et Walters, Eugene Haydn. 2014. « Clinical significance of epithelial mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Potential target for prevention of airway fibrosis and lung cancer », *Clinical and Translational Medicine*, vol. 3, n° 1, p. 33.

Références bibliographiques

Song, Congbo, He, Jianjun, Wu, Lin, Jin, Taosheng, Chen, Xi, Li, Ruipeng, Ren, Peipei, Zhang, Li et Mao, Hongjun. 2017. « Health burden attributable to ambient PM2.5 in China », *Environmental Pollution*, vol. 223, p. 575-586.

Soukup, Joleen M. et Becker, Susanne. 2001. « Human Alveolar Macrophage Responses to Air Pollution Particulates Are Associated with Insoluble Components of Coarse Material, Including Particulate Endotoxin », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 171, n° 1, p. 20-26.

Stavrou, Aikaterini, Ortiz, Angelica et Costa, Max. 2023. « Cadmium Activates EGFR/STAT5 Signaling to Overcome Calcium Chelation and Promote Epithelial to Mesenchymal Transition », *Biomolecules*, vol. 13, n° 1, p. 116.

Steenhof, Maaïke, Gosens, Ilse, Strak, Maciej, Godri, Krystal J., Hoek, Gerard, Cassee, Flemming R., Mudway, Ian S., Kelly, Frank J., Harrison, Roy M., Lebret, Erik, Brunekreef, Bert, Janssen, Nicole AH et Pieters, Raymond HH. 2011. « In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential - the RAPTES project », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 8, n° 1, p. 26.

Su, Bojiang, Wang, Tao, Zhang, Guohua, Liang, Yue, Lv, Chen, Hu, Yaohao, Li, Lei, Zhou, Zhen, Wang, Xinming et Bi, Xinhui. 2022. « A review of atmospheric aging of sea spray aerosols: Potential factors affecting chloride depletion », *Atmospheric Environment*, vol. 290, p. 119365.

Sugiyama, Taichi, Ueda, Kayo, Seposo, Xerxes Tesoro, Nakashima, Ayako, Kinoshita, Makoto, Matsumoto, Hiroko, Ikemori, Fumikazu, Honda, Akiko, Takano, Hirohisa, Michikawa, Takehiro et Nitta, Hiroshi. 2020. « Health effects of PM2.5 sources on children's allergic and respiratory symptoms in Fukuoka, Japan », *Science of The Total Environment*, vol. 709, p. 136023.

Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T. M. et Hall, B. M. 2009. « Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells », *Oncogene*, vol. 28, n° 33, p. 2940-2947.

Sun, Hao, Chen, Hui, Yao, Lan, Chen, Jiping, Zhu, Zhonghong, Wei, Yaqi, Ding, Xiang et Chen, Jianmin. 2020. « Sources and health risks of PM2.5-bound polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in a North China rural area », *Journal of Environmental Sciences*, vol. 95, p. 240-247.

Sun, Jian, Shen, Zhenxing, Zeng, Yaling, Niu, Xinyi, Wang, Jinhui, Cao, Junji, Gong, Xuesong, Xu, Hongmei, Wang, Taobo, Liu, Hongxia et Yang, Liu. 2018. « Characterization and cytotoxicity of PAHs in PM2.5 emitted from residential solid fuel burning in the Guanzhong Plain, China », *Environmental Pollution*, vol. 241, p. 359-368.

Syn, Nicholas, Wang, Lingzhi, Sethi, Gautam, Thiery, Jean-Paul et Goh, Boon-Cher. 2016. « Exosome-mediated metastasis: From epithelial-mesenchymal transition to escape from immunosurveillance », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 37, n° 7, p. 606-617.

Tadokoro, Akira, Kanaji, Nobuhiro, Liu, Dage, Yokomise, Hiroyasu, Haba, Reiji, Ishii, Tomoya, Takagi, Takehiro, Watanabe, Naoki, Kita, Nobuyuki, Kadowaki, Norimitsu et Bando, Shuji. 2016. « Vimentin regulates invasiveness and is a poor prognostic marker in non-small cell lung cancer », *Anticancer Research*, vol. 36, n° 4, p. 1545-1551.

Références bibliographiques

- Tam, A., Hughes, M., McNagny, K. M., Obeidat, M., Hackett, T. L., Leung, J. M., Shaipanich, T., Dorscheid, D. R., Singhera, G. K., Yang, C. W. T., Paré, P. D., Hogg, J. C., Nickle, D. et Sin, D. D. 2019. « Hedgehog signaling in the airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease », *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, p. 1-13.
- Taparra, Kekoa, Tran, Phuoc T. et Zachara, Natasha E. 2016. « Hijacking the hexosamine biosynthetic pathway to promote EMT-mediated neoplastic phenotypes », *Frontiers in Oncology*, vol. 6, n° 85.
- Thevenot, Paul T., Saravia, Jordy, Jin, Nili, Giaimo, Joseph D., Chustz, Regina E., Mahne, Sarah, Kelley, Matthew A., Hebert, Valeria Y., Dellinger, Barry, Dugas, Tammy R., DeMayo, Francesco J. et Cormier, Stephania A. 2013. « Radical-containing ultrafine particulate matter initiates epithelial-to-mesenchymal transitions in airway epithelial cells », *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 48, n° 2, p. 188-197.
- Thiery, Jean Paul, Acloque, Hervé, Huang, Ruby Y. J. et Nieto, M. Angela. 2009. « Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease », *Cell*, vol. 139, n° 5, p. 871-890.
- Thomson, Errol M., Breznan, Dalibor, Karthikeyan, Subramanian, MacKinnon-Roy, Christine, Charland, Jean-Pierre, Dabek-Zlotorzynska, Ewa, Celis, Valbona, Kumarathasan, Prem, Brook, Jeffrey R. et Vincent, Renaud. 2015. « Cytotoxic and inflammatory potential of size-fractionated particulate matter collected repeatedly within a small urban area », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 12, n° 1, p. 24.
- Thorpe, Alistair et Harrison, Roy M. 2008. « Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review », *Science of The Total Environment*, vol. 400, n° 1, p. 270-282.
- Tirino, V., Camerlingo, R., Bifulco, K., Irollo, E., Montella, R., Paino, F., Sessa, G., Carriero, M. V., Normanno, N., Rocco, G. et Pirozzi, G. 2013. « TGF- β 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction », *Cell Death & Disease*, vol. 4, n° 5, p. e620-e620.
- Tsai, Ming-Yi, Hoek, Gerard, Eeftens, Marloes, Hoogh, Kees de, Beelen, Rob, Beregszászi, Timea, Cesaroni, Giulia, Cirach, Marta, Cyrus, Josef, De Nazelle, Audrey, Vocht, Frank de, Ducret-Stich, Regina, Eriksen, Kirsten, Galassi, Claudia, Gražuleviciene, Regina, Gražulevicius, Tomas, Grivas, Georgios, Gryparis, Alexandros, Heinrich, Joachim, Hoffmann, Barbara, Iakovides, Minas, Keuken, Menno, Krämer, Ursula, Künzli, Nino, Lanki, Timo, Madsen, Christian, Meliefste, Kees, Merritt, Anne-Sophie, Mølter, Anna, Mosler, Gioia, Nieuwenhuijsen, Mark J., Pershagen, Göran, Phuleria, Harish, Quass, Ulrich, Ranzi, Andrea, Schaffner, Emmanuel, Sokhi, Ranjeet, Stempfelet, Morgane, Stephanou, Euripides, Sugiri, Dorothea, Taimisto, Pekka, Tewis, Marjan, Udvardy, Orsolya, Wang, Meng et Brunekreef, Bert. 2015. « Spatial variation of PM elemental composition between and within 20 European study areas — Results of the ESCAPE project », *Environment International*, vol. 84, p. 181-192.
- Tsai, Shang-Shyue et Yang, Chun-Yuh. 2014. « Fine particulate air pollution and hospital admissions for pneumonia in a subtropical city: Taipei, Taiwan », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 77, n° 4, p. 192-201.
- Tseng, Po-Chun, Chen, Chia-Ling, Lee, Kang-Yuan, Feng, Po-Hao, Wang, Yu-Chih, Satria, Rahmat Dani et Lin, Chiou-Feng. 2022. « Epithelial-to-mesenchymal transition hinders interferon- γ -dependent immunosurveillance in lung cancer cells », *Cancer Letters*, vol. 539, p. 215712.

Références bibliographiques

- Valavanidis, Athanasios, Fiotakis, Konstantinos et Vlachogianni, Thomais. 2008. « Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms », *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, vol. 26, n° 4, p. 339-362.
- Valavanidis, Athanasios, Vlachogianni, Thomais, Fiotakis, Konstantinos et Loridas, Spyridon. 2013. « Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms », *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 10, n° 9, p. 3886-3907.
- Valcourt, Ulrich, Kowanetz, Marcin, Niimi, Hideki, Heldin, Carl-Henrik et Moustakas, Aristidis. 2005. « TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition », *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, n° 4, p. 1987-2002.
- Viana, M., Kuhlbusch, T. A. J., Querol, X., Alastuey, A., Harrison, R. M., Hopke, P. K., Winiwarter, W., Vallius, M., Szidat, S., Prévôt, A. S. H., Hueglin, C., Bloemen, H., Wåhlin, P., Vecchi, R., Miranda, A. I., Kasper-Giebl, A., Maenhaut, W. et Hitzemberger, R. 2008. « Source apportionment of particulate matter in Europe: A review of methods and results », *Journal of Aerosol Science*, vol. 39, n° 10, p. 827-849.
- Visalli, Giuseppa, Baluce, Barbara, Bertuccio, Maria, Picerno, Isa et Pietro, Angela Di. 2015. « Mitochondrial-mediated apoptosis pathway in alveolar epithelial cells exposed to the metals in combustion-generated particulate matter », *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 78, n° 11, p. 697-709.
- Vu, Trung, Jin, Lin et Datta, Pran K. 2016. « Effect of cigarette smoking on epithelial to mesenchymal transition (EMT) in lung cancer », *Journal of Clinical Medicine*, vol. 5, n° 4, p. 44.
- Vuong, Ngoc Q., Breznan, Dalibor, Goegan, Patrick, O'Brien, Julie S., Williams, Andrew, Karthikeyan, Subramanian, Kumarathasan, Premkumari et Vincent, Renaud. 2017. « In vitro toxicoproteomic analysis of A549 human lung epithelial cells exposed to urban air particulate matter and its water-soluble and insoluble fractions », *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 14, n° 1, p. 39.
- Waked, A., Favez, O., Alleman, L. Y., Piot, C., Petit, J.-E., Delaunay, T., Verlinden, E., Golly, B., Besombes, J.-L., Jaffrezo, J.-L. et Leoz-Garziandia, E. 2014. « Source apportionment of PM₁₀ in a north-western Europe regional urban background site (Lens, France) using positive matrix factorization and including primary biogenic emissions », *Atmospheric Chemistry and Physics*, vol. 14, n° 7, p. 3325-3346.
- Wang, Guanghe, Zhang, Xiaofeng, Liu, Xinyan et Zheng, Jing. 2020. « Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM_{2.5}: a comparison of growth under ALI and submerged conditions », *Toxicology Research*, vol. 9, n° 5, p. 636-651.
- Wang, Hao, Zhang, Ge, Zhang, Huan, Zhang, Fan, Zhou, Binhua, Ning, Fen, Wang, Hong-Sheng, Cai, Shao-Hui et Du, Jun. 2014. « Acquisition of epithelial–mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway », *European Journal of Pharmacology*, vol. 723, p. 156-166.

Références bibliographiques

- Wang, Yadong, Zhai, Wenlong, Wang, Haiyu, Xia, Xiangqun et Zhang, Congke. 2015. « Benzo(a)pyrene promotes A549 cell migration and invasion through up-regulating Twist », *Archives of Toxicology*, vol. 89, n° 3, p. 451-458.
- Wang, Yan et Tang, Meng. 2019. « PM2.5 induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance », *Environmental Pollution*, vol. 254, p. 112937.
- Wang, Yunxia, Zhong, Yijue, Hou, Tianfang, Liao, Jiping, Zhang, Cheng, Sun, Chao et Wang, Guangfa. 2019. « PM2.5 induces EMT and promotes CSC properties by activating Notch pathway in vivo and vitro », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 178, p. 159-167.
- Wang, Yunxia, Zhong, Yijue, Liao, Jiping et Wang, Guangfa. 2021. « PM2.5-related cell death patterns », *International Journal of Medical Sciences*, vol. 18, n° 4, p. 1024-1029.
- Wedepohl, Hans K. 1995. « The composition of the continental crust », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 59, n° 7, p. 1217-1232.
- Wei, Hongying, Liang, Fan, Cheng, Wei, Zhou, Ren, Wu, Xiaomeng, Feng, Yan et Wang, Yan. 2017. « The mechanisms for lung cancer risk of PM2.5: Induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human non-small cell lung cancer cells », *Environmental Toxicology*, vol. 32, n° 11, p. 2341-2351.
- Weiss, Carsten, Faust, Dagmar, Dürk, Heike, Kolluri, Siva Kumar, Pelzer, Anke, Schneider, Sandra, Dietrich, Cornelia, Oesch, Franz et Göttlicher, Martin. 2005. « TCDD induces c-jun expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway », *Oncogene*, vol. 24, n° 31, p. 4975-4983.
- WHO. 2021. *WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide*, Geneva : World Health Organization.
- WHO. 2020. *Asthma*.
- WHO. 2018. *Ambient (outdoor) air pollution*.
- WHO. 2005. *Air quality guidelines: Global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide* World Health Organization.
- Winsor, Nathaniel, Krustev, Christian, Bruce, Jessica, Philpott, Dana J. et Girardin, Stephen E. 2019. « Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells », *Cellular Microbiology*, vol. 21, n° 11, p. e13079.
- Wu, Yongfeng, Niu, Yuequn, Leng, Jing, Xu, Jinming, Chen, Hanwen, Li, Hongyi, Wang, Luming, Hu, Jian, Xia, Dajing et Wu, Yihua. 2020. « Benzo(a)pyrene regulated A549 cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by up-regulating long non-coding RNA linc00673 », *Toxicology Letters*, vol. 320, p. 37-45.
- Wu, Zhuang, Yang, Leilei, Cai, Lin, Zhang, Min, Cheng, Xuan, Yang, Xiao et Xu, Jun. 2007. « Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an α -smooth muscle actin-Cre transgenic mouse », *Respiratory Research*, vol. 8, n° 1, p. 1.
- Xiao, Dakai et He, Jianxing. 2010. « Epithelial mesenchymal transition and lung cancer », *Journal of Thoracic Disease*, vol. 2, n° 3, p. 154-159.

Références bibliographiques

Xu, Diandou, Dan, Mo, Song, Yan, Chai, Zhifang et Zhuang, Guoshun. 2005. « Concentration characteristics of extractable organohalogens in PM_{2.5} and PM₁₀ in Beijing, China », *Atmospheric Environment*, vol. 39, n° 22, p. 4119-4128.

Xu, Fanfan, Qiu, Xinghua, Hu, Xinyan, Shang, Yu, Pardo, Michal, Fang, Yanhua, Wang, Junxia, Rudich, Yinon et Zhu, Tong. 2018. « Effects on IL-1 β signaling activation induced by water and organic extracts of fine particulate matter (PM_{2.5}) in vitro », *Environmental Pollution*, vol. 237, p. 592-600.

Xu, Fanfan, Shi, Xiaodi, Qiu, Xinghua, Jiang, Xing, Fang, Yanhua, Wang, Junxia, Hu, Di et Zhu, Tong. 2020. « Investigation of the chemical components of ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) associated with in vitro cellular responses to oxidative stress and inflammation », *Environment International*, vol. 136, p. 105475.

Xu, Zihan, Ding, Wenjun et Deng, Xiaobei. 2019. « PM_{2.5}, fine particulate matter: A novel player in the epithelial-mesenchymal transition? », *Frontiers in Physiology*, vol. 10, n° 1404.

Xu, Zihan, Li, Zilin, Liao, Ziyi, Gao, Sumeng, Hua, Li, Ye, Xiaofei, Wang, Yu, Jiang, Shan, Wang, Ning, Zhou, Dan et Deng, Xiaobei. 2019. « PM_{2.5} induced pulmonary fibrosis in vivo and in vitro », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 171, p. 112-121.

Xu, Zihan, Wang, Ning, Xu, Ye, Hua, Li, Zhou, Dan, Zheng, Min et Deng, Xiaobei. 2019. « Effects of chronic PM_{2.5} exposure on pulmonary epithelia: Transcriptome analysis of mRNA-exosomal miRNA interactions », *Toxicology Letters*, vol. 316, p. 49-59.

Yamashita, Motozo, Fatyol, Karoly, Jin, Chaoyang, Wang, Xiangchun, Liu, Zhenggang et Zhang, Ying E. 2008. « TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and p38 by TGF- β », *Molecular Cell*, vol. 31, n° 6, p. 918-924.

Yan, Junyan, Lai, Chia-Hsiang, Lung, Shih-Chun Candice, Chen, Chongjun, Wang, Wen-Cheng, Huang, Pin-I et Lin, Chia-Hua. 2017. « Industrial PM_{2.5} cause pulmonary adverse effect through RhoA/ROCK pathway », *Science of The Total Environment*, vol. 599-600, p. 1658-1666.

Yang, Dan, Ma, Mingyue, Zhou, Weiqiang, Yang, Biao et Xiao, Chunling. 2017. « Inhibition of miR-32 activity promoted EMT induced by PM_{2.5} exposure through the modulation of the Smad1-mediated signaling pathways in lung cancer cells », *Chemosphere*, vol. 184, p. 289-298.

Yang, Haiping, Wang, Longqiang, Zhao, Jun, Chen, Yongbing, Lei, Zhe, Liu, Xia, Xia, Wei, Guo, Lingling et Zhang, Hong-Tao. 2015. « TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer », *Lung Cancer*, vol. 87, n° 3, p. 249-257.

Yang, Haiyan, Zhang, Hongsheng, Pan, Teng, Wang, Haiyu et Wang, Yadong. 2018. « Benzo(a)pyrene promotes migration, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells by upregulating TGIF », *Toxicology Letters*, vol. 294, p. 11-19.

Yang, Jing, Antin, Parker, Berx, Geert, Blanpain, Cédric, Brabletz, Thomas, Bronner, Marianne, Campbell, Kyra, Cano, Amparo, Casanova, Jordi, Christofori, Gerhard, Dedhar, Shoukat, Derynck, Rik, Ford, Heide L., Fuxe, Jonas, García de Herreros, Antonio, Goodall, Gregory J., Hadjantonakis, Anna-Katerina, Huang, Ruby J. Y., Kalcheim, Chaya, Kalluri, Raghu, Kang, Yibin, Khew-Goodall, Yeesim, Levine, Herbert, Liu, Jinsong, Longmore, Gregory D., Mani, Sendurai A., Massagué, Joan, Mayor, Roberto, McClay, David, Mostov, Keith E., Newgreen, Donald F., Nieto, M. Angela, Puisieux, Alain, Runyan, Raymond, Savagner, Pierre,

Références bibliographiques

- Stanger, Ben, Stemmler, Marc P., Takahashi, Yoshiko, Takeichi, Masatoshi, Theveneau, Eric, Thiery, Jean Paul, Thompson, Erik W., Weinberg, Robert A., Williams, Elizabeth D., Xing, Jianhua, Zhou, Binhua P. et Sheng, Guojun. 2020. « Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, p. 1-12.
- Yang, Lawei, Liu, Gang, Lin, Ziyang, Wang, Yahong, He, Huijuan, Liu, Tie et Kamp, David W. 2016. « Pro-inflammatory response and oxidative stress induced by specific components in ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells », *Environmental Toxicology*, vol. 31, n° 8, p. 923-936.
- Yang, Muh-Hwa, Wu, Min-Zu, Chiou, Shih-Hwa, Chen, Po-Min, Chang, Shyue-Yih, Liu, Chung-Ji, Teng, Shu-Chun et Wu, Kou-Juey. 2008. « Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis », *Nature Cell Biology*, vol. 10, n° 3, p. 295-305.
- Yang, Yan-Long, Chen, Ming-Wu et Xian, Lei. 2014. « Prognostic and Clinicopathological Significance of Downregulated E-Cadherin Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Meta-Analysis », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 6, p. e99763.
- Yaqub, Naheem, Wayne, Gareth, Birchall, Martin et Song, Wenhui. 2022. « Recent advances in human respiratory epithelium models for drug discovery », *Biotechnology Advances*, vol. 54, p. 107832.
- Yi, Shuo, Zhang, Fang, Qu, Fang et Ding, Wenjun. 2014. « Water-insoluble fraction of airborne particulate matter (PM10) induces oxidative stress in human lung epithelial A549 cells », *Environmental Toxicology*, vol. 29, n° 2, p. 226-233.
- Yilmaz, Mahmut et Christofori, Gerhard. 2009. « EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion », *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 28, n° 1, p. 15-33.
- Yousef, Mohamed H., Salama, Mohamed, El-Fawal, Hassan A. N. et Abdelnaser, Anwar. 2022. « Selective GSK3 β Inhibition Mediates an Nrf2-Independent Anti-inflammatory Microglial Response », *Molecular Neurobiology*, vol. 59, n° 9, p. 5591-5611.
- Yuan, Qi, Chen, Yaoyao, Li, Xiaobo, Zhang, Zhengdong et Chu, Haiyan. 2019. « Ambient fine particulate matter (PM2.5) induces oxidative stress and pro-inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 839, p. 40-48.
- Yuan, Xun, Wu, Hua, Han, Na, Xu, Hanxiao, Chu, Qian, Yu, Shiyang, Chen, Yuan et Wu, Kongming. 2014. « Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: Biological significance and therapeutic application », *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 7, n° 1, p. 87.
- Yue, Dongsheng, Li, Hui, Che, Juanjuan, Zhang, Yi, Tseng, Hsin-Hui K., Jin, Joy Q., Luh, Thomas M., Giroux-Leprieur, Etienne, Mo, Minli, Zheng, Qingfeng, Shi, Huaiyin, Zhang, Hua, Hao, Xishan, Wang, Changli, Jablons, David M. et He, Biao. 2014. « Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas », *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 33, n° 1, p. 34.
- Yue, Zhiwei et Fraser, Matthew P. 2004. « Polar organic compounds measured in fine particulate matter during TexAQS 2000 », *Atmospheric Environment*, vol. 38, n° 20, p. 3253-3261.
- Zeisberg, Michael et Neilson, Eric G. 2009. « Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions », *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, n° 6, p. 1429-1437.

Références bibliographiques

Zhai, Xuedi, Wang, Jianshu, Sun, Jiaojiao et Xin, Lili. 2022. « PM_{2.5} induces inflammatory responses via oxidative stress-mediated mitophagy in human bronchial epithelial cells », *Toxicology Research*, vol. 11, n° 1, p. 195-205.

Zhang, J, Yang, L, Chen, J, Mellouki, A, Jiang, P, Gao, Y, Li, Y, Yang, Y et Wang, W. 2016. « Influence of fireworks displays on the chemical characteristics of PM_{2.5} in rural and suburban areas in Central and East China. », *The Science of the Total Environment*, vol. 578, p. 476-484.

Zhang, Jinsong et Ma, Li. 2012. « MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis », *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 31, n° 3, p. 653-662.

Zhang, Xiaoju, Liu, Guangzhi, Kang, Yi, Dong, Zhaogang, Qian, Qiyu et Ma, Xitao. 2013. « N-Cadherin Expression Is Associated with Acquisition of EMT Phenotype and with Enhanced Invasion in Erlotinib-Resistant Lung Cancer Cell Lines », *PLOS ONE*, vol. 8, n° 3, p. e57692.

Zhao, Fei et Klimecki, Walter T. 2015. « Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model », *Journal of Applied Toxicology*, vol. 35, n° 8, p. 945-951.

Zhao, Zhongquan, Cheng, Xiaoming, Wang, Yubo, Han, Rui, Li, Li, Xiang, Tong, He, Luhang, Long, Haixia, Zhu, Bo et He, Yong. 2014. « Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis », *PLOS ONE*, vol. 9, n° 4.

Zhou, Qing-Xin, Jiang, Xing-Ming, Wang, Zhi-Dong, Li, Chun-Long et Cui, Yun-Fu. 2015. « Enhanced expression of suppressor of cytokine signaling 3 inhibits the IL-6-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cholangiocarcinoma cell metastasis », *Medical Oncology*, vol. 32, n° 4, p. 105.

Zou, Yajuan, Jin, Chengyu, Su, Yue, Li, Jiaru et Zhu, Bangshang. 2016. « Water soluble and insoluble components of urban PM_{2.5} and their cytotoxic effects on epithelial cells (A549) in vitro », *Environmental Pollution*, vol. 212, p. 627-635.

Site Internet : Infoclimat. « Climatologie mensuelle en octobre 2020 à Lille-Lesquin | climatologie depuis 1900 - Infoclimat », URL : <https://www.infoclimat.fr/climatologie-mensuelle/07015/octobre/2020/lille-lesquin.html>, consulté le 20 janvier 2021a.

Site Internet : Infoclimat. « Climatologie mensuelle en janvier 2021 à Saint-Tricat | climatologie depuis 1900 - Infoclimat », URL : <https://www.infoclimat.fr/climatologie-mensuelle/000S2/janvier/2021/saint-tricat.html>, consulté le 20 janvier 2021b.

Site Internet : Infoclimat. « Climatologie mensuelle en novembre 2020 à Dunkerque | climatologie depuis 1900 - Infoclimat », URL : <https://www.infoclimat.fr/climatologie-mensuelle/07010/novembre/2020/dunkerque.html>, consulté le 20 janvier 2021c.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Sélection des filtres soumis aux plus fortes influences maritimes et industrielles pour les extraits sous influences spécifiques.

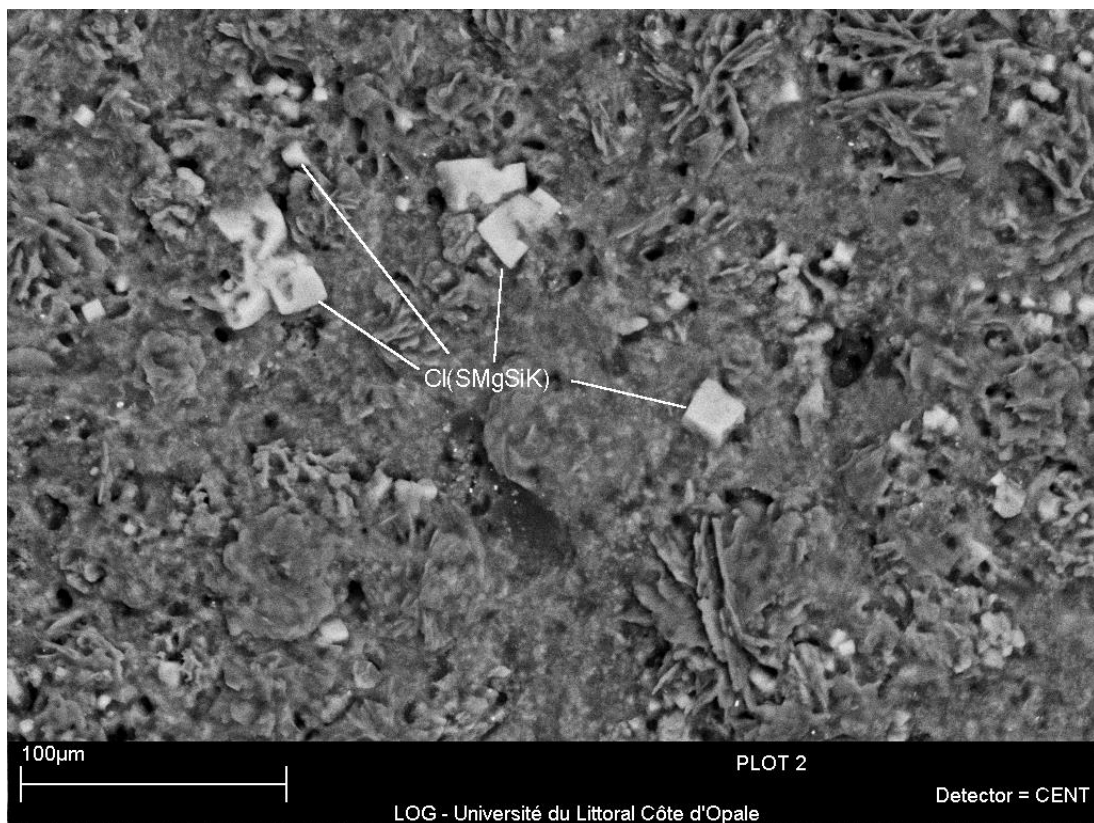
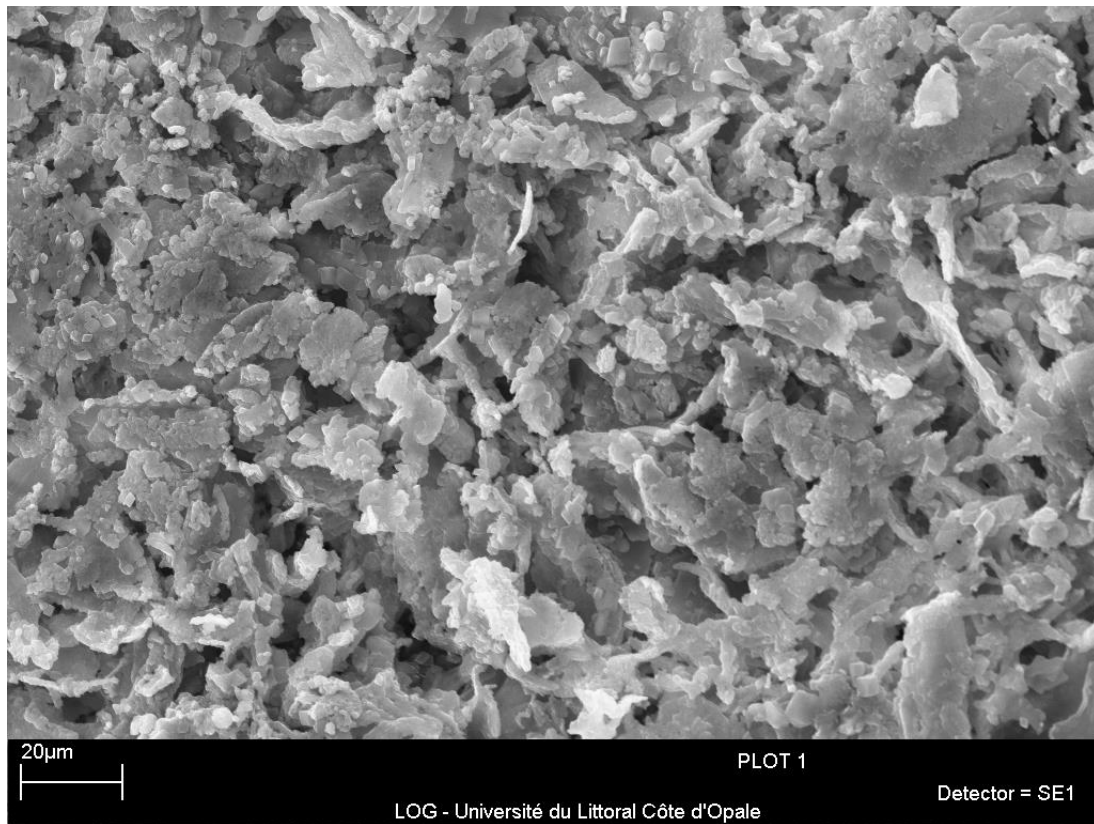
Influences	Spécifique maritime	Spécifique industrielle
Sélection de filtres	23/11/2020	23/11/2020
	26/11/2020	01/12/2020
	02/12/2020	02/12/2020
	03/12/2020	24/12/2020
	13/12/2020	25/12/2020
	18/12/2020	29/12/2020
	19/12/2020	31/12/2020
	24/12/2020	02/01/2021
	25/12/2020	04/01/2021
	31/12/2020	05/01/2021
	02/01/2021	

Annexes

Annexe 2 : Concentrations en éléments métalliques et en ions (ng.m⁻³) analysées sur le lyophilisat de la fraction hydrosoluble des PM_{2,5} sous l'influence maritime

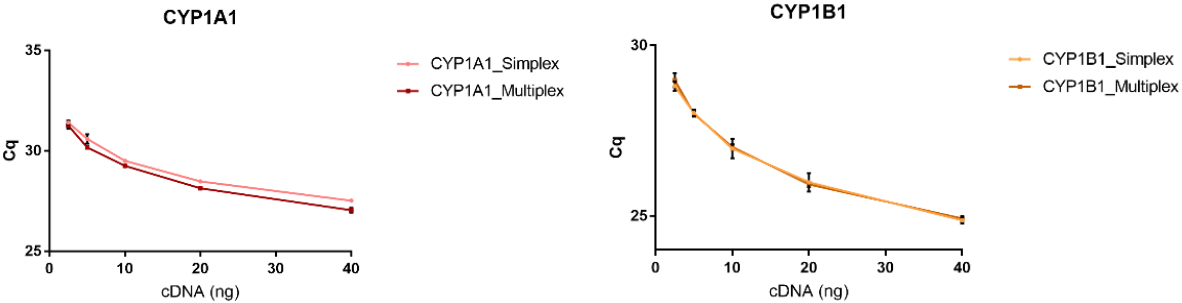
Eléments métalliques	Ag	2,9
	As	0,42
	Bi	0,09
	Cd	0,15
	Ce	0,04
	Co	0,06
	Cr	0,71
	Cu	1,5
	Fe	40
	La	0,06
	Mn	2,7
	Ni	0,78
	Pb	4,1
	Rb	0,32
	Sb	0,64
	Sn	0,82
	Te	0,09
	Ti	1,0
	Tl	0,04
	V	0,67
Zn	10,6	
Ions hydrosolubles	Ca ²⁺	26,9
	Cl ⁻	306
	K ⁺	96
	Li ⁺	3,9
	Mg ²⁺	26,6
	Na ⁺	238
	NH ₄ ⁺	798
	NO ₃ ⁻	1782
	SO ₄ ²⁻	922

Annexe 3 : Images réalisées au microscope électronique à balayage couplée à l'analyse X sur (1) un échantillon de lyophilisat de PM_{10} et (2) un échantillon du lyophilisat de $PM_{2.5}$ sous influence maritime, afin de vérifier l'absence de fibres et la présence d'éléments métalliques.

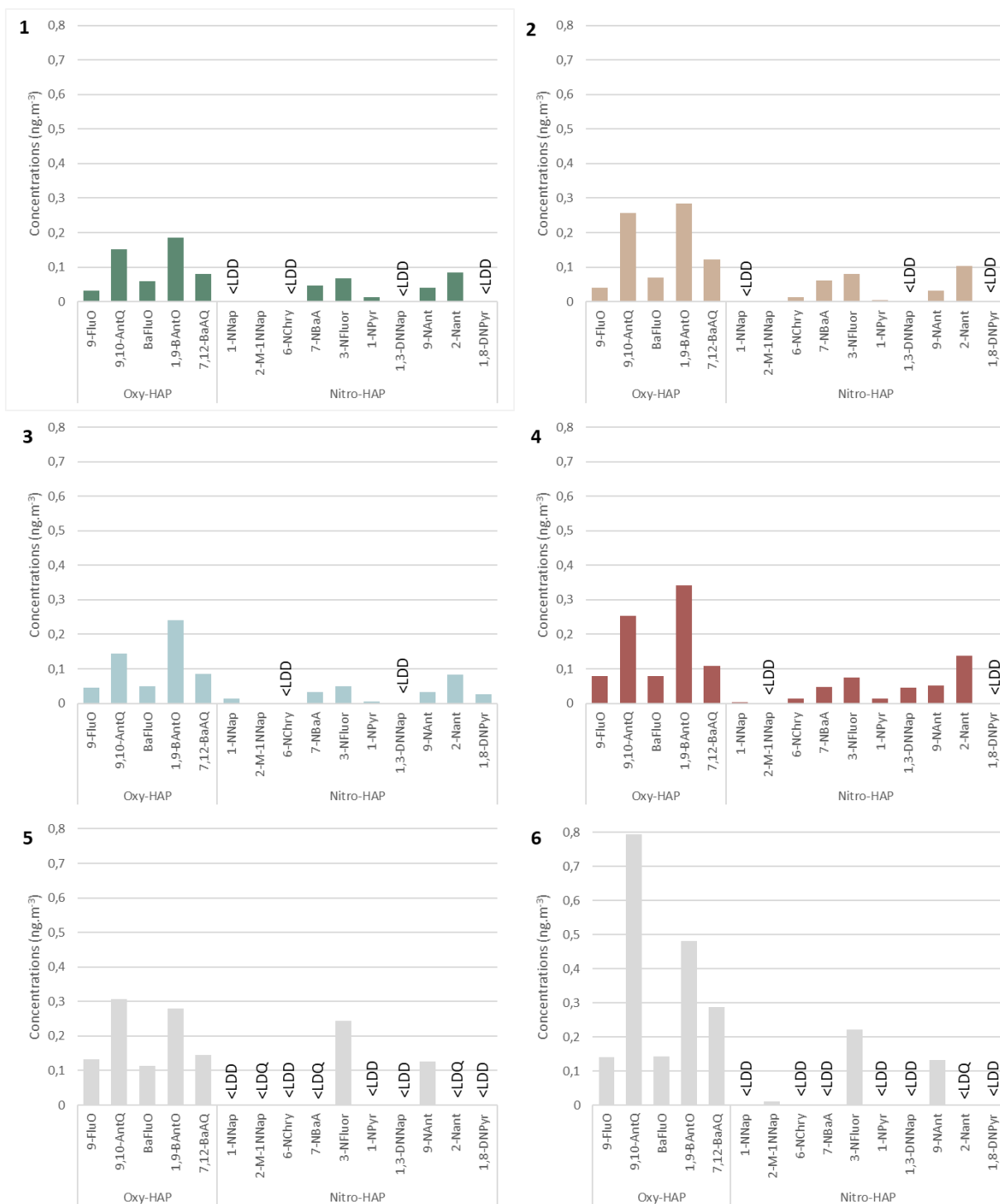


Annexes

Annexe 4: Cycle de quantification en fonction de l'ADNc de CYP1A1 et CYP1B1 étudiés en qPCR avec ou sans multiplexage



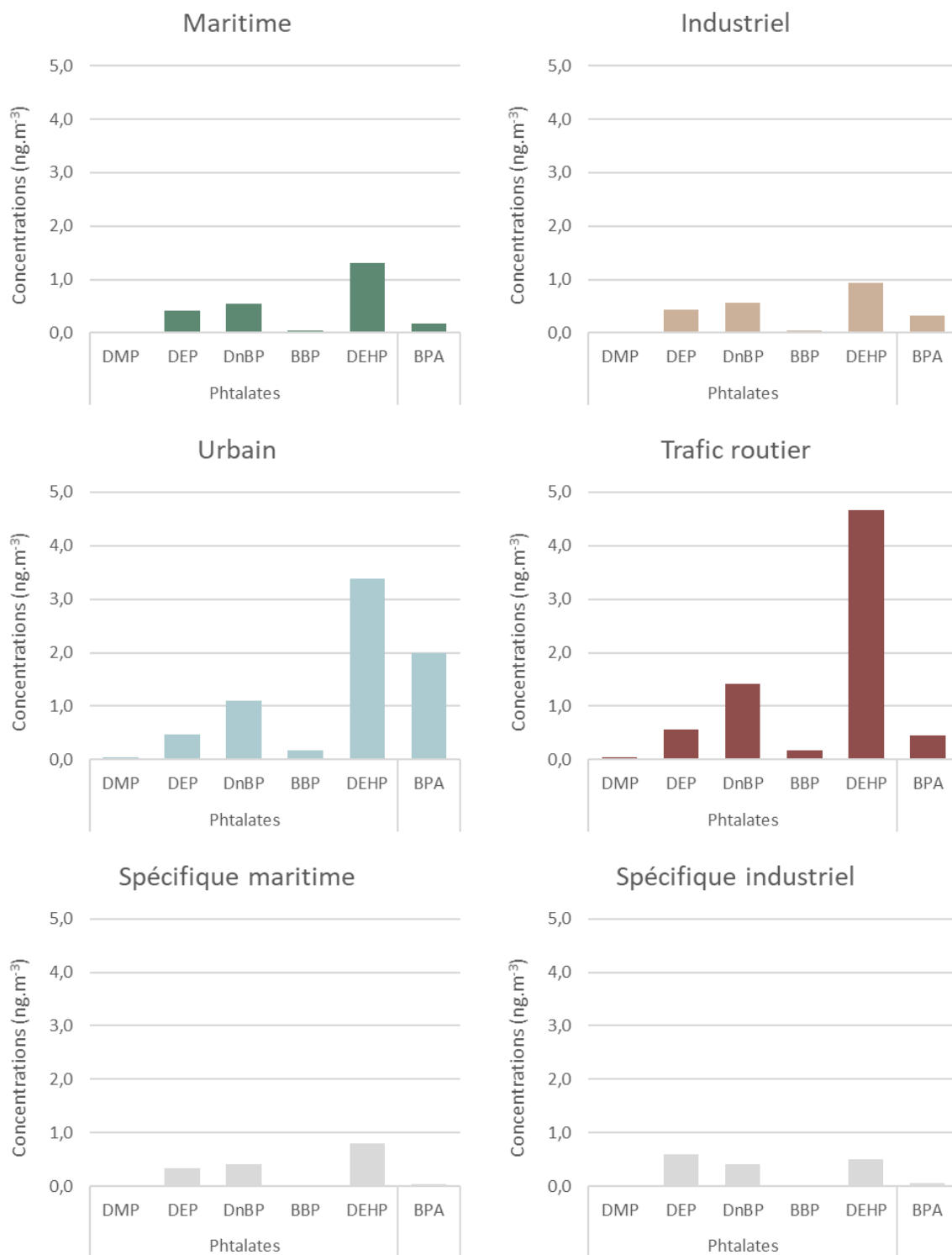
Annexe 5 : Concentrations en oxy- et nitro-HAP (ng.m⁻³) selon les différentes influences (1 : maritime, 2 : industriel, 3 : urbain, 4 : trafic routier, 5 : spécifique maritime, 6 : spécifique industriel).



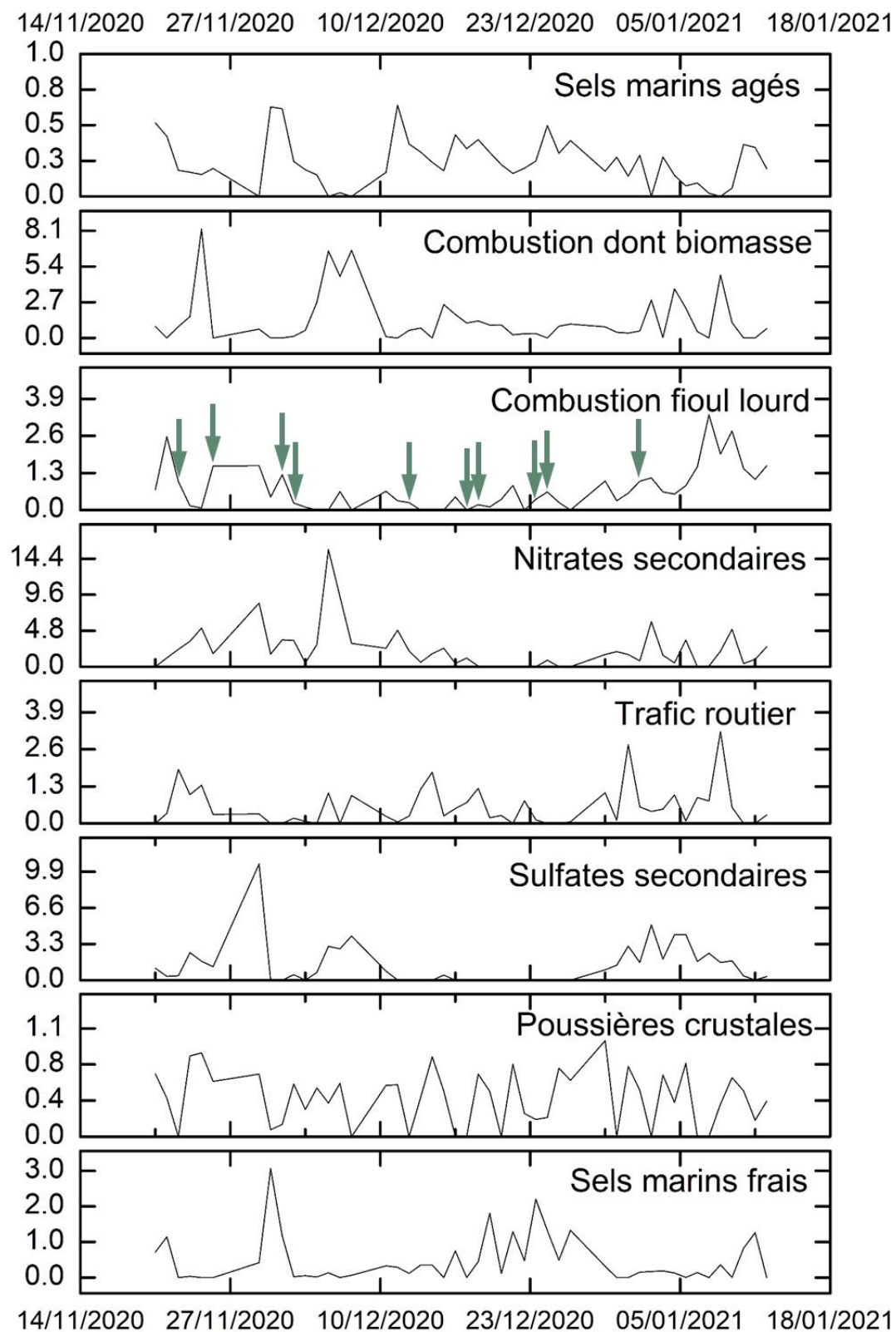
Annexes

Annexe 6 : Concentrations des phtalates et bisphénol A (en ng.m^{-3}) dans les $\text{PM}_{2,5}$ selon les influences.

DMP : diméthyl phtalate, DEP : diéthyl phtalate, DBP : dibutyl phtalate, BBP : benzyl butyl phtalate, BEHP : bis(2-ethylhexyl) phtalate, BPA : bisphénol A.

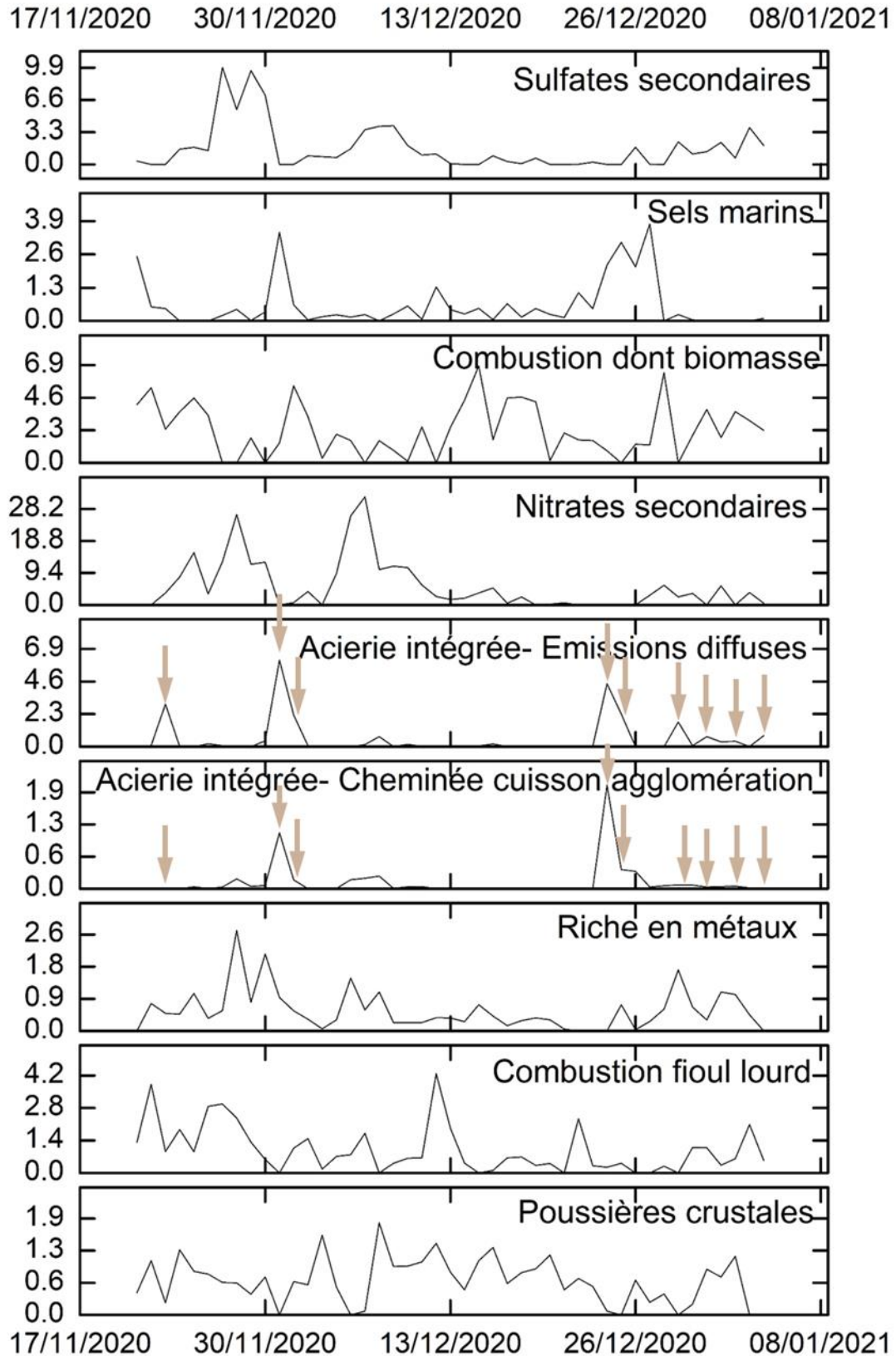


Annexe 7 : Evolution temporelle des contributions de sources sur la période d'échantillonnage sur le site sous influence maritime ; sont fléchés les jours sélectionnés pour l'échantillon spécifique, sur la source visée.

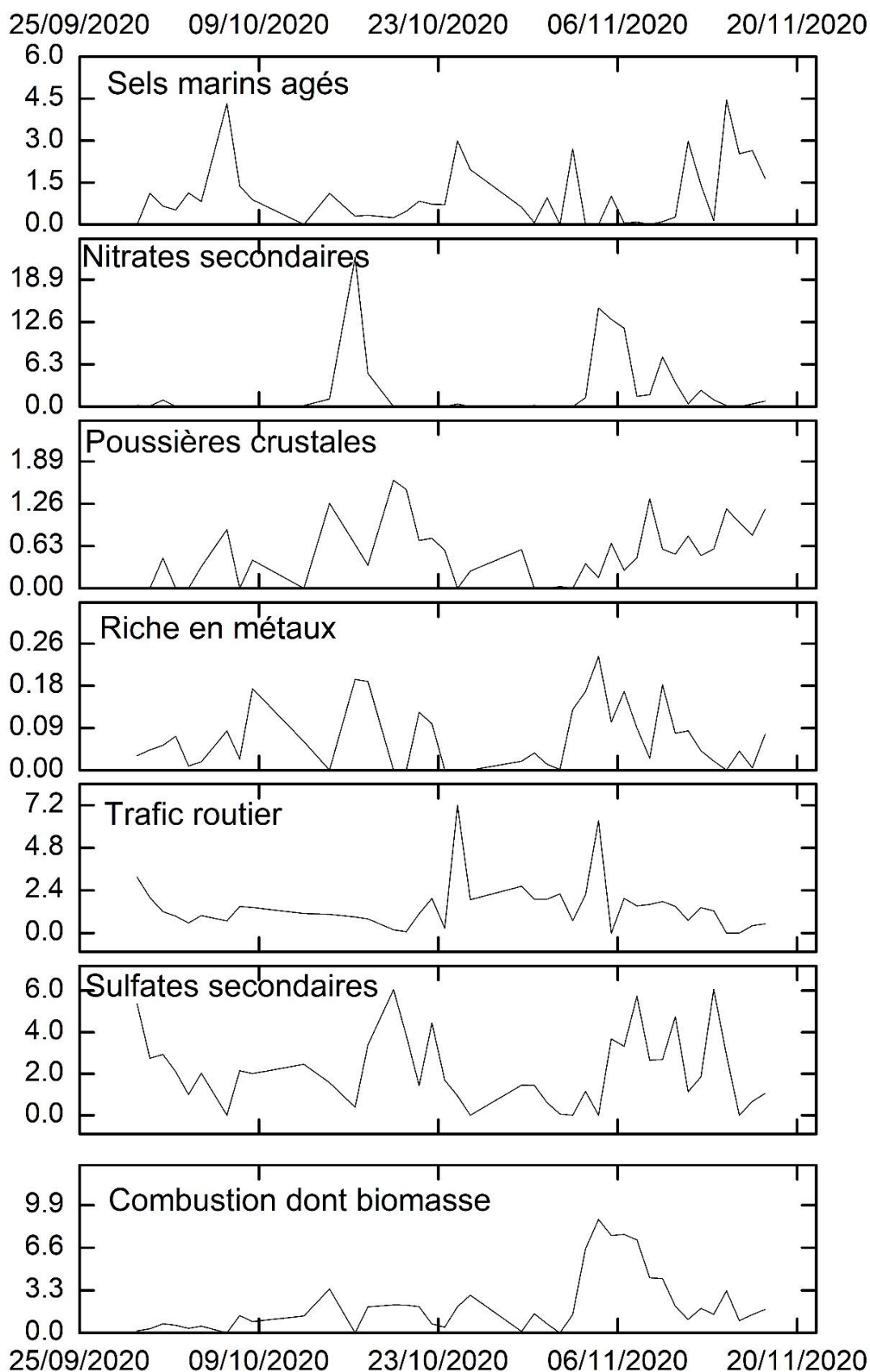


Annexes

Annexe 8 : Evolution temporelle des contributions de sources sur la période d'échantillonnage sur le site sous influence industrielle ; sont fléchés les jours sélectionnés pour l'échantillon spécifique, sur la source visée.

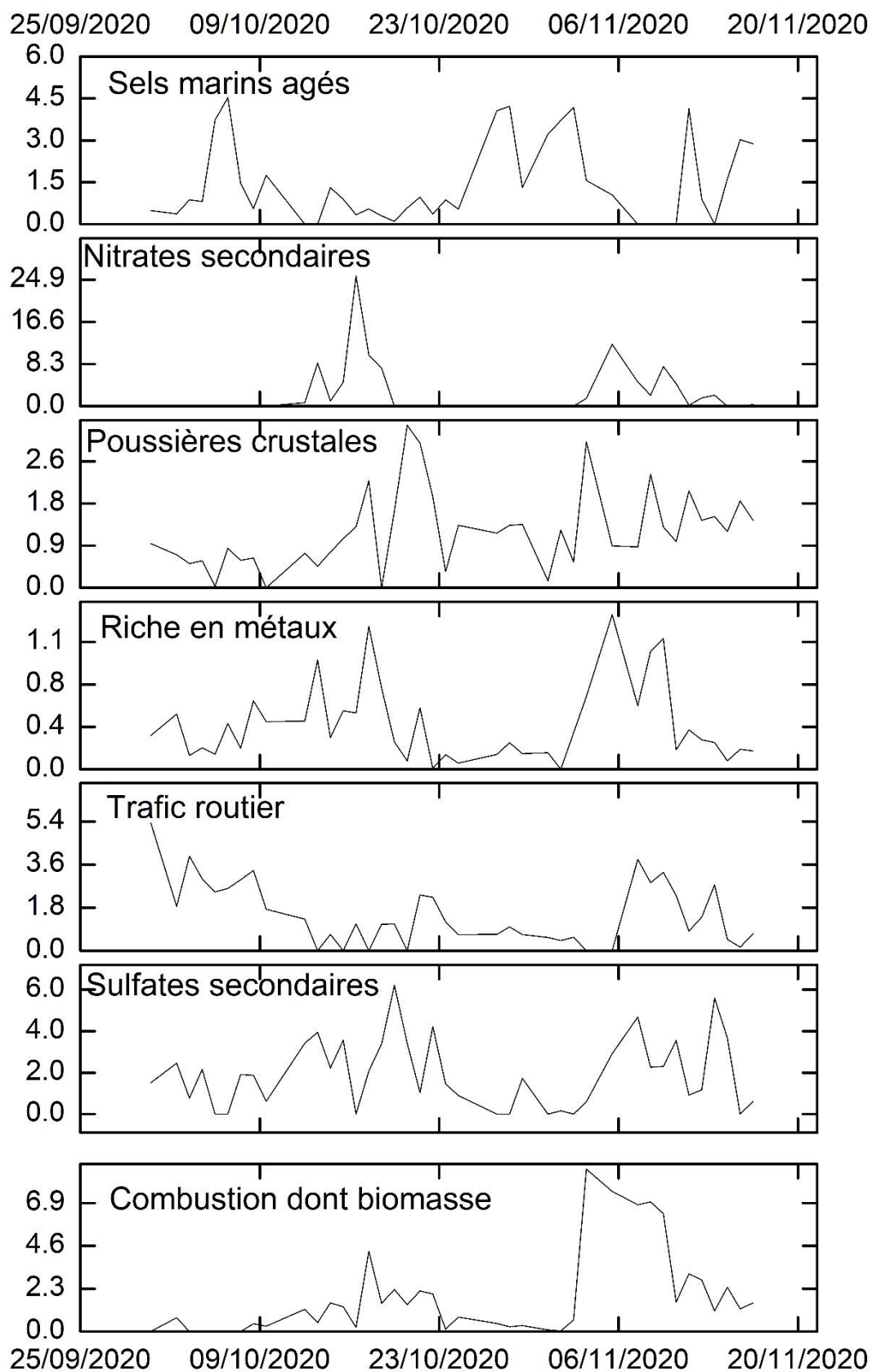


Annexe 9 : Evolution temporelle des contributions de sources sur la période d'échantillonnage sur le site sous influence urbaine



Annexes

Annexe 10 : Evolution temporelle des contributions de sources sur la période d'échantillonnage sur le site sous influence trafic routier



Toxicité des particules atmosphériques issues de zones urbano-industrielles et portuaires et impact sur la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires

Les particules fines atmosphériques (PM_{2.5}) sont classées depuis dix ans comme cancérigène de groupe I pour l'Homme. Elles sont connues pour avoir une composition variée, dépendant de leurs origines, et pour se déposer dans l'appareil respiratoire jusqu'au niveau alvéolaire. L'exposition à ces composés a été associée à plusieurs maladies telles que l'asthme, la BPCO et la progression du cancer au stade métastatique. Toutes ces pathologies sont en relation avec le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). C'est pourquoi des PM_{2.5} issues de 4 influences différentes : maritime, industrielle, urbaine et du trafic routier ; ont été caractérisées. Deux modèles cellulaires pulmonaires : A549 et BEAS-2B, ont été exposés aux PM_{2.5} sous forme d'extraits hydrosolubles et organiques. Les mécanismes de toxicité induits par les PM_{2.5} comme l'inflammation, le stress oxydant et la métabolisation des xénobiotiques ont été étudiés, ainsi que la TEM. Une augmentation significative de ces trois paramètres a été observée particulièrement sur l'extrait hydrosoluble de PM_{2.5} sous influence industrielle, et sur les deux extraits sous influence du trafic routier. Plusieurs voies de signalisation telles que AhR et Nrf2 ont pu être identifiées suite aux expositions. La TEM a été induite après 7 jours d'exposition aux extraits organiques et hydrosolubles de PM_{2.5} issus de l'influence trafic routier de manière plus prononcée. En conclusion, les résultats montrent la capacité des PM_{2.5} à déclencher la TEM de manière différente selon leurs origines. Par ailleurs, certaines voies de signalisation sont impliquées dans la réponse cellulaire aux xénobiotiques, mais aussi dans le mécanisme de TEM. Ainsi, l'intérêt d'identifier des mécanismes tel que la TEM est important afin de comprendre plus en détails l'impact de la pollution atmosphérique sur la santé.

Mots clefs : particules fines (PM_{2.5}), inflammation, stress oxydant, métabolisation des xénobiotiques, transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Toxicity of atmospheric fine particulate matter from urban, industrial and harbor influences and their impact on epithelial to mesenchymal transition in lung cells

Fine particulate matter (PM_{2.5}) have been classified as group 1 carcinogenic to humans for ten years. Their chemical composition depends on their origins, and can deposit throughout the respiratory tract until the alveolar level. Exposure to those compounds has been associated with several diseases such as asthma, COPD and cancer progression to the metastasis phase. These pathologies are all connected to epithelial to mesenchymal transition (EMT). This is why PM_{2.5} from 4 influences, maritime, industrial, urban and road traffic, were characterized. Two cellular lung models: A549 and BEAS-2B, were exposed to water-soluble and organic extracts of PM_{2.5}. Toxicological mechanisms like inflammation, oxidative stress and xenobiotic metabolization, known to be induced by PM_{2.5}, were studied. A significant increase of all three parameters was observed, notably for the water-soluble PM_{2.5} extract of industrial origin, and for both extracts of road traffic origin. Several signaling pathways like AhR and Nrf2 have been identified following extracts' exposure. EMT was induced after exposure for 7 days to water soluble and organic PM_{2.5} extracts of road traffic origin. To conclude, results show PM_{2.5} capacities to induce EMT, in various ways depending on PM origin. Furthermore, several signaling pathways are involved in xenobiotics' cellular response, but also in EMT mechanisms. Thus, the interest of identifying mechanisms such as EMT are important in order to understand in detail the impact of air pollution on health.

Keywords: Fine particulate matter (PM_{2.5}), inflammation, oxidative stress, xenobiotic metabolization, epithelial to mesenchymal transition (EMT)