



HAL
open science

Influence de l'âge et du tabac sur les mécanismes génomotoxiques et épigénétiques précoces de cancérogénèse broncho-pulmonaire en réponse à la pollution particulaire urbaine

Bertrand Fougère

► **To cite this version:**

Bertrand Fougère. Influence de l'âge et du tabac sur les mécanismes génotoxiques et épigénétiques précoces de cancérogénèse broncho-pulmonaire en réponse à la pollution particulaire urbaine. Toxicologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2014. Français. NNT : 2014DUNK0377 . tel-01288911

HAL Id: tel-01288911

<https://theses.hal.science/tel-01288911>

Submitted on 15 Mar 2016

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

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



Université du Littoral Côte d'Opale

UCEiV EA4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant

Ecole Doctorale 104 SMRE, Science de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement

THESE

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale**

Discipline : **Toxicologie**

**INFLUENCE DE L'AGE ET DU TABAC SUR LES
MECANISMES GENOTOXIQUES ET EPIGENETIQUES PRECOCS
DE CANCEROGENESE BRONCHO-PULMONAIRE
EN REPONSE A LA POLLUTION PARTICULAIRE URBAINE**

Présentée par :

Bertrand FOUGERE

le 04 septembre 2014

Réalisée sous la direction de Monsieur le **Professeur François SICHEL**

et de Monsieur le **Docteur Sylvain BILLET**

COMPOSITION DU JURY :

François PUISIEUX	Professeur,	Université de Lille II	Président
Lydie SPARFEL	Professeur,	Université de Rennes I	Rapporteur
Matteo CESARI	Professeur,	Université de Toulouse III	Rapporteur
Pierre GOSSET	Professeur,	Université Catholique de Lille	Examineur
Jean-Claude MEURICE	Professeur,	Université de Poitiers	Examineur
François SICHEL	Professeur,	Université de Caen-Basse Normandie	Directeur
Sylvain BILLET	Maître de Conférences,	Université du Littoral Côte d'Opale	Encadrant

L'âge est une donnée biologique socialement manipulable et manipulée.

Pierre Bourdieu *Scientifique, Sociologue (1930 - 2002)*

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Pirouz SHIRALI, celui sans qui rien ne se serait passé... Dès notre première rencontre vous avez cru en moi et vous m'avez dit que je devais être « une valeur ajoutée » à votre équipe. Malgré mon absence de connaissances en toxicologie, vous m'avez accordé votre confiance. Vous étiez un homme à l'emploi du temps chargé mais vous saviez toujours être à l'écoute et vous aviez toujours une attention particulière pour chacun de nous. J'espère que vous auriez été fier du travail accompli. Je vous serai éternellement reconnaissant.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse,

Monsieur le Professeur François PUISIEUX, un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordée dès mon arrivée à Lille jusqu'à me recommander pour un nouveau poste à Toulouse. Je suis vraiment honoré que vous ayez accepté de présider ce jury aujourd'hui.

Madame le Professeur Lydie SPARFEL, merci beaucoup de me donner votre expertise toxicologique en évaluant mon manuscrit.

Monsieur le Professeur Mattéo CESARI, un grand merci d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et de me donner votre approche gériatrique sur le sujet.

Monsieur le Professeur Pierre GOSSET, merci pour ton soutien sans faille tout au long de cette thèse. Tu es un maillon essentiel qui fait le lien permanent entre le monde hospitalier et celui de la recherche. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur Jean-Claude MEURICE, vous avez déjà été président de mon jury de thèse de médecine. Aujourd'hui, je suis touché que vous fassiez l'expertise de mon travail.

Monsieur le Professeur François SICHEL, sans aucune hésitation, vous avez repris la direction de ma thèse à la suite du Professeur SHIRALI. Je vous en suis très reconnaissant. Votre recul et vos conseils sur mon travail ont été pour moi d'une grande aide.

Monsieur le Docteur Sylvain BILLET, ça y est, terminé les 36 000 mails, textos et appels répétitifs durant ces 2 ans ½...Tu vas pouvoir souffler. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide précieuse et ton soutien dans cette thèse. Tu étais mon encadrant, tu es devenu un ami.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement **Monsieur le Professeur Marc PACCALIN**. Tu m'as fait découvrir et aimer la gériatrie, tu m'as poussé dans mes travaux et mes projets. Malgré la distance, tu gardes toujours un œil affectueux sur « ton élève ». Merci pour ton soutien sans faille.

Capucine LEPERS, mon binôme de travail pendant toute ma thèse. Tu auras été pour moi un véritable pilier. Sache que j'ai appris énormément avec toi au cours de ces années. Excellente scientifiquement, tu es également humainement exceptionnelle. Je ne te remercierai jamais assez pour ton aide et ta patience.

Yann LANDKOCZ. Merci pour les nuits blanches passées à m'aider dans mes manip. Tu t'es toujours montré disponible et prêt à rendre service, et en plus tu es toujours de bonne humeur. C'est vraiment un plaisir de travailler avec toi.

Perrine MARTIN. Ton arrivée a donné un second souffle au laboratoire. Tu apportes la touche de « biologie féminine » dans notre laboratoire de « toxicologues masculins » et ce n'est pas toujours facile... Nos discussions, pas uniquement scientifiques, ont toujours été très agréables. Merci pour ta disponibilité et tes encouragements.

Anthony VERDIN, indispensable au laboratoire, sur qui on peut toujours compter.
Merci pour ta présence et ton soutien.

Merci à tous ceux qui sont passés au laboratoire ces dernières années et qui m'ont beaucoup aidé. Je pense plus particulièrement à **Lucie ARMAND** et **Boris CACHON**.

Merci également au **Professeur Dominique COURCOT**, Directeur de l'UCEIV et responsable de l'équipe « Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques », pour sa présence et son implication au quotidien dans notre Unité.

Merci à tous les membres du **Centre Commun de Mesures de l'ULCO** pour la collecte et la caractérisation des PM_{2.5}.

Je remercie aussi le **Professeur Françoise ROY SAINT-GEORGES** pour la réalisation des lavages broncho-alvéolaires ainsi que tous mes collègues du service de Gériatrie du Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, **Autilia**, **Colette**, **Céline**, **Stéphanie**, **Fabienne** et **Bénédicte** qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures des conditions.

Je voudrais remercier **Claire**, mon épouse, ma moitié, qui me soutient et me pousse au quotidien dans tous mes projets professionnels et personnels. Merci d'être là pour moi, tous les jours, dans les moments de joie et dans les moments difficiles. Merci également à mon petit garçon, **Jules**, d'être le soleil de mes journées depuis bientôt 3 ans.

Merci à ma **grand-mère**, mes **parents**, mes **frères**, ma **sœur** et mon **beau-frère** pour leur soutien indéfectible, leur amour et leur présence. Merci d'être là, toujours là... J'ai également aujourd'hui une pensée spéciale pour mon grand-père qui je l'espère serait fier de son petit-fils.

Enfin, merci à mes amis : **Pierre-Yves, Thibault.P, Thibaut.T** et **Samuel** pour leur affection, leur soutien moral, et d'être là pour moi depuis tant d'années ainsi qu'à tous nos **amis lillois** qui nous ont chaleureusement accueillis et intégrés depuis 4 ans.

SOUTIEN INSTITUTIONNEL ET FINANCIER

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce au soutien :

- de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) et de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur la Vivant (UCEIV, EA4492), qui m'ont accueilli dans leur structure.



- du Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille et de Lille Métropole Communauté Urbaine, qui ont financé mon doctorat.

groupement des **Hôpitaux**
de l'Institut Catholique de Lille



- des organismes qui ont financé ces travaux de recherche :
 - l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, convention n° EST-2007-48) ;
 - l'Institut National du Cancer (INCa, convention n° 2010-368) ;
 - l'Institut de Recherches en Environnement Industriel (IRENI), financé par la Communauté Urbaine de Dunkerque, la Région Nord - Pas de Calais, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le Centre National de la Recherche Scientifique et le Fond Européen de Développement Régional (FEDER).



VALORISATION SCIENTIFIQUE

Les travaux présentés dans cette thèse ont été valorisés sous la forme de publications et de communications lors de congrès. La liste détaillée en est présentée ci-dessous.

I. Publications dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture :

- Articles originaux de recherche :

Fougère B, Lepers C, Landkocz Y, Armand L, Martin PJ, Grossin N, Verdin A, Gosset P, Sichel F, Shirali P, Boulanger E, Billet S. Role of aging in the modulation of epigenetics events of carcinogenesis after exposure to air pollution. *Aging Cell* (soumis).

- Actes dans des congrès internationaux :

Lepers C, Armand L, Verdin A, Martin P.J, Fougère B, Dewaele D, Cazier F, Billet S, Shirali P. Particulate matter samples from various origins induce different genotoxic effects and epigenetic modifications in bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187:A1224, 2013. (IF 2012 = 11,080)

II. Communications lors de congrès internationaux :

- Communications orales :

Lepers C, Armand L, Verdin A, Martin P.J, Fougère B, Dewaele D, Cazier F, Billet S, Shirali P. Particulate matter samples from various origins induce different genotoxic effects and epigenetic modifications in bronchial epithelial cells. *American Thoracic Society International Conference (ATS) – Philadelphie – 17 – 22/05/2013*. Poster commenté.

Fougère B, Billet S, Lepers C, Armand L, Martin P, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Genotoxic and epigenetic modifications in blood lymphocytes exposed in vitro to urban air pollution particulate matter: Influence of age. *20^{ème} Congrès de l'International Association of Gerontology and Geriatrics (IAGG) – Seoul – 26/06/2013*.

Fougère B, Billet S, Lepers C, Martin P.J, Armand L, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali. Role of aging in the modulation of early events of carcinogenesis after exposure in vitro to urban pollution particulate matter. *13th Conference of the International Society Of Geriatric Oncology (SIOG) – Copenhagen – 24 – 26/10/2013*. Poster commenté.

III. Communications lors de congrès nationaux :

- **Communications orales :**

Fougère B, Billet S, Lepers C, Armand L, Martin P, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Influence de l'âge sur la réponse biologique de lymphocytes sanguins exposés in vitro à la pollution atmosphérique particulaire urbaine. *32^{èmes} Journées annuelles de la Société Française de Gériatrie et Gérontologie (SFGG) – Paris – 03/10/2012*.

Fougère B, Billet S, Lepers C, Armand L, Martin P, Landkocz Y, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Exposition ex vivo aux particules atmosphériques urbaines de lymphocytes sanguins : influence de l'âge sur les modifications génotoxiques et épigénétiques. *7^{èmes} Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'air 2014 (JIQA) – Lille – 10/02/2014*.

- **Communications affichées :**

Fougère B, Billet S, Lepers C, Armand L, Bulckaen H, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Influence de l'âge sur les conséquences épigénétiques de l'exposition aux particules atmosphériques urbaines. *44^{èmes} Journées de la Société de Gériatrie de l'Ouest et du Centre (SGOC) – Tours – 25 – 26/05/2012*.

Fougère B, Billet S, Lepers C, Martin P.J, Armand L, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Iliescu C, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Sensibilité des personnes âgées à la pollution atmosphérique : modulation des mécanismes précoces de cancérogenèse ? *45^{èmes} Journées de la Société de Gériatrie de l'Ouest et du Centre (SGOC) – La Rochelle – 07 – 08/06/2013*.

Fougère B, Billet S, Lepers C, Martin P.J, Armand L, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali. Effet du vieillissement sur les modifications génotoxiques et épigénétiques induites par l'exposition in vitro à des particules atmosphériques urbaines. *33^{èmes} Journées annuelles de la Société française de Gériatrie et de Gérontologie (SFGG) – Paris – 08 – 10/10/2013*.

IV. Journées scientifiques locales ou régionales :

- Communications affichées :

Fougère B, Billet S, Lepers C, Armand L, Bulckaen H, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Influence de l'âge sur les conséquences épigénétiques de l'exposition aux particules atmosphériques urbaines. *Journée de la recherche de l'Université Catholique de Lille – Lille – 25/05/2012.*

Fougère B, Billet S, Lepers C, Martin P.J, Armand L, Bulckaen H, Roy Saint-Georges F, Verdin A, Gosset P, Shirali P. Modifications génotoxiques et épigénétiques des lymphocytes sanguins exposés in vitro à la pollution atmosphérique particulaire urbaine : Influence de l'âge. *6^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest – Deauville – 15 – 17/05/2013.*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES TABLEAUX	XVII
ABREVIATIONS & NOTATION	XIX
AVANT-PROPOS	XXII
<i>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	1
1. Pollution atmosphérique particulaire	3
1.1. Quelques définitions	3
1.2. Principaux polluants	5
1.3. Réglementation relative aux polluants atmosphériques.....	6
1.4. Origine des particules atmosphériques.....	12
1.5. Caractéristiques physico-chimiques des particules	21
1.6. Contexte local	25
2. Système respiratoire : anatomie, toxicocinétique des particules inhalées et cancer du poumon	31
2.1. Anatomie et histocytologie	31
2.2. Toxicocinétique des particules atmosphériques	37
2.3. Cancer du poumon : épidémiologie, facteurs de risque et classification.....	41
3. Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse broncho-pulmonaire : influence de l'âge, du statut tabagique et de la pollution	54
3.1. Cancérogénèse broncho-pulmonaire : processus multi-étapes.....	54
3.2. Stress oxydant et Inflammation.....	56
3.3. Activation métabolique	62
3.4. Mécanismes génotoxiques.....	66
3.5. Instabilité chromosomique, oncogènes et suppresseurs de tumeur	74
3.6. Mécanismes épigénétiques.....	77
<i>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS</i>	92
<i>MATÉRIELS ET MÉTHODES</i>	97
1. Matériels	98
1.1. Matériels chimiques : échantillons de PM _{2.5}	98
1.2. Matériels biologiques	102
2. Méthodes	113
2.1. Culture et exposition des cellules	113
2.2. Paramètres de toxicité.....	115

RÉSULTATS	129
1. Notation des échantillons	130
2. Influence de l'âge dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse : Modèle des lymphocytes exposés aux PM_{2.5}	131
2.1. Caractéristiques des numérations formules sanguines	131
2.2. Activité télomérase	133
2.3. Longueur des télomères	135
2.4. Méthylation du promoteur de <i>P16^{INK4A}</i>	139
2.5. Expression génique de <i>P16^{INK4A}</i>	141
2.6. Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i>	144
2.7. Expression génique de <i>MGMT</i>	146
3. Rôle du statut tabagique dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse : Modèle des co-cultures Macrophages Alvéolaires / cellules BEAS-2B exposés au PM_{2.5}	149
3.1. Caractéristiques des Lavages Broncho-Alvéolaires.....	149
3.2. Activité télomérase	150
3.3. Longueur des télomères	153
3.1. Méthylation des promoteurs de <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i>	158
3.2. Expression génique de <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i>	160
DISCUSSION GÉNÉRALE	165
1. Influence de l'âge dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse liés à la toxicité des PM_{2.5}	168
2. Rôle du statut tabagique dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse liés à la toxicité des PM_{2.5}	173
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	180
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	184
ANNEXE	204

LISTE DES FIGURES

Les numéros des pages indiquent la première citation de la figure dans le texte.

Analyse Bibliographique

Figure 1 : Comparaison de la taille d'un cheveu humain et d'un grain de sable avec celle des particules PM ₁₀ et PM _{2,5}	3
Figure 2 : Représentation schématique des principales sources de particules atmosphériques....	12
Figure 3 : Représentation schématique de la distribution granulométrique des aérosols et de leurs mécanismes de formation et de dépôt.....	14
Figure 4 : Emissions de PM _{2,5} , en kilotonnes et par secteur, en France métropolitaine	16
Figure 5 : Répartition par secteur d'activité des émissions de métaux, polluants organiques persistants et précurseurs de particules secondaires en France métropolitaine en 2010.....	18
Figure 6 : Images en microscopie électronique d'une particule biologique, d'un phyllosilicate, d'une particule carbonée, d'une particule métallique et de particules émises par un moteur diesel	24
Figure 7 : Localisation de l'agglomération de Dunkerque et des sites industriels.....	27
Figure 8 : Répartition dans la région Nord-Pas-de-Calais des émissions atmosphériques en SO ₂ (A), oxydes d'azote, benzène, CO ₂ , composés organiques volatiles non-méthaniques et plomb	28
Figure 9 : Répartition dans la région Nord-Pas de Calais des émissions atmosphériques de particules en suspension tous secteurs confondus et secteur majoritairement responsable des émissions de particules par commune.....	29
Figure 10 : Structure de l'appareil respiratoire humain et organisation cellulaire.....	31
Figure 11 : Coupe histologique d'alvéole pulmonaire de porc, mettant en évidence des macrophages alvéolaires.....	36
Figure 12 : Mécanismes de déposition des particules	39
Figure 13 : Évolution de l'incidence (taux standardisé monde estimé) du cancer du poumon de 1980 à 2005 selon le sexe	44
Figure 14 : Taux standardisés à la population mondiale (TSM) d'incidence des cancers du poumon à l'échelle régionale en France métropolitaine en 2005	45
Figure 15 : Taux standardisés à la population mondiale (TSM) de mortalité par cancer du poumon à l'échelle départementale en France métropolitaine (2004-2008).....	46
Figure 16 : Classification des cancers broncho-pulmonaires.....	49
Figure 17 : Coupes histologiques de tumeurs pulmonaires de type	50
Figure 18 : Evolution histologique du tissu normal vers le carcinome <i>in situ</i>	52

Figure 19 : Propriétés des cellules cancéreuses.....	55
Figure 20 : Réponse cellulaire aux espèces réactives de l'oxygène.....	56
Figure 21 : Production d'espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydant enzymatiques et non enzymatiques	57
Figure 22 : Conséquence des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN, les lipides et les protéines	58
Figure 23 : Réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat, en fonction de la masse et de la surface spécifique des particules.....	59
Figure 24 : Production de ROS par la réaction de Fenton dépendante du fer	60
Figure 25 : Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques.....	62
Figure 26 : Actions génotoxiques directes et indirectes.....	66
Figure 27 : Structure du télomère et de la télomérase	70
Figure 28 : Différents niveaux de compaction de l'ADN.....	77
Figure 29 : Nucléosome	78
Figure 30 : Résidus des histones sujets à des modifications post-traductionnelles chez les mammifères.....	79
Figure 31 : Conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine par la méthyltransférase.....	83
Figure 32 : Méthylation de novo et de maintenance.....	85
Figure 33 : Différence de profil de méthylation entre les cellules normales et cancéreuses.....	86
Figure 34 : Coopération entre les mécanismes épigénétiques dans la régulation de la compaction de la chromatine	91

Problématique & Objectifs

Figure 35 : Protocole expérimental : Recherche de l'influence de l'âge dans la toxicité des PM _{2.5}	95
Figure 36 : Protocole expérimental : Recherche de l'influence du statut tabagique dans la toxicité des PM _{2.5}	96

Matériels & Méthodes

Figure 37 : Localisation des sites de prélèvement.....	98
Figure 38 : Systèmes de prélèvement de particules en suspension dans l'air.....	98
Figure 39 : Modèle de co-culture Macrophages Alvéolaires / cellules BEAS-2B.....	109
Figure 40 : Représentation des différents éléments cellulaires du sang circulant.....	111
Figure 41 : Réaction de conversion au bisulfite des cytosines en fonction de leur niveau de méthylation.....	121

Résultats

Figure 42 : Activité télomérase, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux PM _{2.5} après 72 h de mise en culture.	133
Figure 43 : Activité télomérase, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.....	134
Figure 44 : Activité télomérase des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.	134
Figure 45 : Longueur des télomères, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux PM _{2.5} après 72 h de mise en culture.	135
Figure 46 : Longueur des télomères, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.....	136
Figure 47 : Longueur des télomères des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.....	136
Figure 48 : Méthylation du promoteur de <i>P16^{INK4A}</i> , rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux PM _{2.5} après 72 h de mise en culture.	139
Figure 49 : Méthylation du promoteur de <i>P16^{INK4A}</i> , rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.	140
Figure 50 : Méthylation du promoteur de <i>P16^{INK4A}</i> des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.	140
Figure 51 : Expression du gène <i>P16^{INK4A}</i> , rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux PM _{2.5} après 72 h de mise en culture.	141
Figure 52 : Expression du gène <i>P16^{INK4A}</i> , rapportée aux lymphocytes non-exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.....	142
Figure 53 : Expression du gène <i>P16^{INK4A}</i> des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.	142
Figure 54 : Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux PM _{2.5} après 72 h de mise en culture.	144
Figure 55 : Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux PM _{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.	145

Figure 56 : Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes 25-30 ans exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de 45 $\mu\text{g} / \text{mL}$	145
Figure 57 : Expression du gène <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.	146
Figure 58 : Expression du gène <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de 45 $\mu\text{g} / \text{mL}$	147
Figure 59 : Expression du gène <i>MGMT</i> , rapportée aux lymphocytes exposés de la classe d'âge 25-30 ans, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de 45 $\mu\text{g} / \text{mL}$	147
Figure 60 : Activité télomérase des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, rapportée aux témoins non-exposés.	151
Figure 61 : Activité télomérase des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs. ...	152
Figure 62 : Longueur des télomères des cellules BEAS-2B et des macrophages alvéolaire exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, rapportée aux témoins non-exposés.....	154
Figure 63 : Longueur des télomères des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs.	155
Figure 64 : Méthylation des promoteurs des gènes <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i> des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, rapportée aux témoins non-exposés. .	158
Figure 65 : Méthylation des promoteurs des gènes <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i> des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs.....	159
Figure 66 : Expression des gènes <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i> des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, rapportée aux témoins non-exposés.....	161
Figure 67 : Expression des gènes <i>MGMT</i> et <i>P16^{INK4A}</i> des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs.	162

LISTE DES TABLEAUX

Les numéros des pages indiquent la première citation du tableau dans le texte.

Analyse Bibliographique

Tableau 1 : Polluants réglementés : origines, pollution générée et conséquences sur la santé.....	5
Tableau 2 : Valeurs réglementaires françaises relatives aux polluants atmosphériques.....	11
Tableau 3 : Comparaison, pour une masse donnée, du nombre relatif de particules et de la surface spécifique relative de l'aérosol en fonction du diamètre des particules.....	22
Tableau 4 : Eléments constituant la paroi des voies respiratoires en fonction de la zone considérée.....	35
Tableau 5 : Classement des cancers par incidence et décès, tous sexes confondus, en France, 2011	42
Tableau 6 : Nombre de cas et de décès et taux pour 100 000 personnes-années par tranche d'âge et par sexe « cancer du poumon » en 2011.....	43
Tableau 7 : Loci fréquemment touchés par des pertes d'hétérozygotie dans les différents types de cancers broncho-pulmonaires	75
Tableau 8 : Modifications post traductionnelles d'histones liés à différents polluants.....	80
Tableau 9 : Gènes suppresseurs de tumeur fréquemment hyperméthylés dans les cancers broncho-pulmonaires, regroupés par fonction.....	87

Matériels & Méthodes

Tableau 10 : Paramètres mesurés et techniques utilisées pour la caractérisation des PM _{2.5}	100
Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de PM _{2.5}	101
Tableau 12 : Constituants cellulaires du LBA chez un sujet sain non-fumeur.....	106
Tableau 13 : Effets secondaires possibles du lavage broncho-alvéolaire.....	106
Tableau 14 : Séquence nucléotidique des amorces sens et anti-sens des télomères et du gène 36B4.	120
Tableau 15 : Conditions d'amplifications des télomères et du gène 36B4.....	120
Tableau 16 : Amorces et conditions de PCR utilisées.	124

Résultats

Tableau 17 : Notation des échantillons pour le modèle des lymphocytes exposés aux PM _{2.5}	130
--	-----

Tableau 18 : Notation des échantillons pour le modèle des co-cultures Cellules BEAS-2B / Macrophages Alvéolaires exposés aux PM _{2.5}	130
Tableau 19 : Valeurs normales d'une Numération Formule Sanguine chez l'Homme.....	131
Tableau 20 : Numérations Formules Sanguines dans les trois classes d'âge de patients.	132
Tableau 21 : Caractéristiques des Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA) chez les fumeurs et non- fumeurs de notre étude.....	149

ABRÉVIATIONS & NOTATION

- A**
- ABC : ATP-Binding Cassette
 - ADH : Alcool DésHydrogénase
 - AKR : AldoKétoRéductase
 - ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase
 - ALT : Alternative Lengthening of Telomere
 - As : Arsenic
- B**
- B[a]P : Benzo[a]Pyrène
 - BER : Base Excision Repair
 - BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
 - BrdU : Bromo-2'-désoxyUridine
- C**
- CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire
 - Cd : Cadmium
 - CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
 - CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique
 - COV : Composé Organique Volatil
 - COVM : Composé Organique Volatil Non-Méthanique
 - COx : Oxydes de carbone
 - Ct : Cycle threshold, Cycle seuil
 - CYP : CYtochrome P450
- D**
- D_{ae} : Diamètre Aérodynamique Equivalent
 - DEP : Diesel Exhaust Particle
 - DNMT : DNA MethylTransferase
 - DREAL : Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
- E**
- EHm : Epoxyde Hydrolase microsomale
 - EMX : Enzyme de Métabolisation des Xénobiotiques
- G**
- γ-H2AX : histone H2AX phosphorylée (Ser139)

GC/MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion-S-Transférase

H HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HAT : Histone AcétylTransférase

HDAC : Histone DésAcétylase

Hx : Histone x

I IARC : International Agency for Research on Cancer

IL : Interleukine

INCa : Institut National du Cancer

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale

IRCP : International Commission on Radiological Protection

iREP : Registre des Emissions Polluantes

L LDH : Lactate DésHydrogénase

M MEDDE : Ministère de l'Environnement, du Développement Durable et de l'Energie

MGMT : O⁶-MethylGuanine DNA-MethylTransferase

miRNA : micro-ARN

MPT : Modification Post-Traductionnelle

N NER : Nucleotide Excision Repair

Ni : Nickel

NOx : Oxydes d'Azote

NQO1 : NADPH-Quinone-Oxydoreductase 1

NSCLC : Non Small Cell Lung Carcinoma

O OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O₃ : Ozone

- P** PAF : Platelet Activating Factor
PBS : Phosphate-Buffered Saline
Pb : Plomb
PCB : PolyCholoroBiphényle
PCDD : PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxine
PCDD/F : PCDD et PCDF
PCDF : PolyChloroDibenzoFurane
PM : Particulate Matter
PM_x : Particules dont le diamètre aérodynamique équivalent est inférieur à x µm
PNSE : Plan National Santé Environnement
POP : Polluant Organique Persistant
PPA : Plan de Protection de l'Atmosphère
- Q** [Q1;Q3] : [1^{er} quartile ; 3^{ème} quartile]
qPCR : PCR quantitative en temps réel
- R** ROS : Reactive Oxygen Species
RQ : Relative Quantity
RT : Rétrotranscription
- S** SAM : S-adénosylméthionine
SCC : Squamous Cell Carcinoma
SCLC : Small Cell Lung Carcinoma
SLC : SoLute Carrier
SLCO : SoLute Carrier Organic anion
SOD : SuperOxyde Dismutase
SOx : Oxydes de soufre
SULT : SulfoTransférase
- T** TCDD : 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-*p*-Dioxine
TNF : Tumor Necrosis Factor
- U** UGT : UDP-GlucuronosylTransférase

AVANT-PROPOS

Le principal déterminant du risque de cancer du poumon est aujourd’hui, en France comme dans le reste du monde, le tabac. Le Plan cancer 2009-2013 a permis de dynamiser la lutte contre le tabagisme. Le Plan cancer 2014-2019 poursuit cette action avec pour objectif de réduire la prévalence du tabagisme et les incitations à la consommation de tabac.

La pollution atmosphérique, autre facteur de risque majeur de cancer du poumon, est un véritable problème de santé publique. Elle serait la 13^{ème} cause de mortalité au niveau mondial, responsable de près de 800 000 décès annuels, de 8 % des cancers broncho-pulmonaires et de 5 % des décès par maladies cardio-pulmonaires. Différentes substances peuvent polluer l’air ambiant, parmi lesquelles les particules atmosphériques. L’exposition aux plus fines d’entre elles est associée à l’aggravation ou à l’apparition de différentes pathologies cardio-respiratoires. Ces particules se révèlent être un mélange complexe de composés plus ou moins nocifs ce qui rend d’autant plus difficile l’appréhension de leur toxicité et la compréhension de leurs mécanismes d’action.

Même si l’ensemble de la population peut subir les conséquences d’une exposition aux polluants de l’air, certaines personnes, notamment les plus âgées, sont plus sensibles à l’action des polluants atmosphériques. Parallèlement, les changements démographiques des cinquante dernières années ont eu pour conséquence l’augmentation progressive de l’incidence et de la mortalité liées au cancer dans la population âgée. Face à cette population vieillissante, il semble donc important de s’intéresser à l’influence de l’âge dans l’apparition de mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse.

Cette thèse s’inscrit dans une démarche de compréhension de l’influence de l’âge ou du statut tabagique en tant que facteur de comorbidité dans l’apparition de processus impliqués dans la cancérogénèse broncho-pulmonaire, en lien avec la toxicité des particules atmosphériques.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Pollution atmosphérique particulaire

La première partie de cette revue de la littérature sera consacrée aux particules atmosphériques. Après avoir rappelé quelques éléments de contexte et définitions, nous nous intéresserons aux propriétés physico-chimiques des particules, puis passerons en revue leurs sources naturelles et anthropiques, pour terminer par un point sur la situation dans l'agglomération de Dunkerque.

1.1. Quelques définitions	3
1.2. Principaux polluants	5
1.3. Réglementation relative aux polluants atmosphériques	6
1.3.1. Législation au niveau mondial	6
1.3.2. Législation au niveau européen	6
1.3.3. Législation au niveau français.....	7
1.4. Origine des particules atmosphériques	12
1.4.1. Mécanismes de formation des particules	13
1.4.2. Particules primaires	14
1.4.3. Particules secondaires	17
1.4.4. Dépôt, remise en suspension et transport des particules	19
1.5. Caractéristiques physico-chimiques des particules	21
1.5.1. Propriétés physiques	21
1.5.2. Composition.....	23
1.6. Contexte local	25
1.6.1. Situation du Nord-Pas-de-Calais.....	25
1.6.2. Situation de l'agglomération de Dunkerque	26

1. Pollution atmosphérique particulaire

1.1. Quelques définitions

Les termes d'**aérosols** et **systèmes aérodispersés** font référence à des particules de petite taille dispersées dans un gaz (Seinfeld and Pandis, 2006).

On appelle **particule** (*particle*) toute unité continue de solide ou de liquide, constituée de molécules maintenues entre elles par des forces intermoléculaires, et d'une taille supérieure à 1 nm ; une particule peut également désigner l'association de deux ou plusieurs unités de ce type, maintenues par des forces d'adhésion interparticulaires de telle sorte qu'elles agissent comme une seule unité en termes de suspension ou de déposition. Les particules PM₁₀ et PM_{2.5} (Figure 1) sont les particules de diamètre aérodynamique inférieur respectivement à 10 et 2,5 µm (PM signifie «Particulate Matter»). C'est sur ces classes de particules que porte essentiellement la surveillance depuis une vingtaine d'années, car elles correspondent aux particules dites « respirables ». Jusqu'en 2008, seules les PM₁₀ faisaient l'objet de réglementations européenne et française. Néanmoins, les PM_{2.5} peuvent pénétrer plus profondément dans l'appareil respiratoire humain, la fraction «grossière» ou «coarse» comprise entre 2,5 et 10 µm étant en partie retenue dans les voies respiratoires supérieures. C'est pourquoi l'accent est mis aujourd'hui sur les PM_{2.5}.

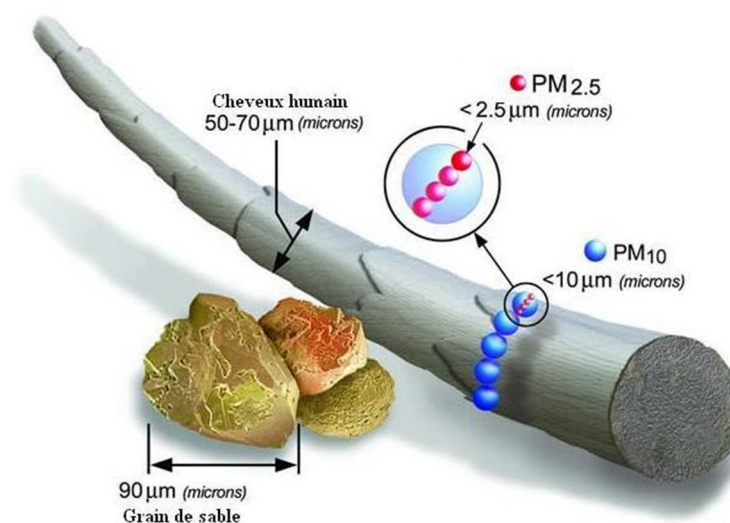


Figure 1 : Comparaison de la taille d'un cheveu humain et d'un grain de sable avec celle des particules PM₁₀ et PM_{2.5}.

Le mot **poussières** (*dusts*) désigne une suspension de particules solides produites par la désintégration mécanique d'un matériau (écrasement, broyage, soufflage), elles ont un diamètre supérieur à 1 μm . Les **poussières sédimentables** sont les particules qui se déposent au niveau du sol ou de toute autre surface, soit par dépôt sec (gravité), soit entraînées par la pluie ou la neige. Les poussières sédimentables sont donc constituées de particules de diamètre aérodynamique variable, mais généralement supérieur à quelques microns. Compte tenu de leur diamètre important, les poussières sédimentables présentent un risque toxicologique direct par inhalation faible pour l'homme, mais constituent une nuisance par les dégradations qu'elles engendrent sur les matériaux et les écosystèmes. De plus, les éléments qu'elles contiennent peuvent s'accumuler dans le sol, contaminer l'écosystème, et entrer dans la chaîne alimentaire.

Le mot **brouillard** (*fog*) est un terme vague appliqué aux aérosols visibles dont la partie dispersée est liquide.

Le terme **smog**, contraction des termes anglais smoke (fumée) et fog (brouillard), désigne une contamination importante de l'air par des aérosols ;

Le mot **fumée** (*smoke*) s'applique à de petites particules portées par un gaz, résultant d'une combustion incomplète, composées principalement de carbone ou autre matériel combustible et présentes en quantité suffisamment importante pour être observables en l'absence d'autres solides, elles ont un diamètre supérieur à 10 nm.

Le terme **suie** (*soot*) caractérise quant à lui des agglomérats de particules de carbone imprégnés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) formés lors de la combustion incomplète de matériaux carbonés.

1.2. Principaux polluants

Le tableau 1 présente les origines, pollution générée et conséquences sur la santé des principaux polluants atmosphériques.

Tableau 1 : Polluants réglementés : origines, pollution générée et conséquences sur la santé (DREAL, 2013).

	Origines	Pollution Générée	Conséquences sur la santé
Dioxyde de soufre : SO₂	Nature : combustion des combustibles fossiles (charbon, fioul). Sources naturelles : activité volcanique, décomposition biologique et feux de forêt. Sources anthropiques : centrales thermiques, combustions industrielles et chauffage. Diminution des émissions en raison de l'importance de l'énergie nucléaire, ainsi que de celles liées au transport en raison de la suppression progressive du soufre dans les carburants.	Formation d'acide sulfurique dans l'atmosphère : pluies acides, acidification des sols, dégradation des bâtiments.	Irritant des muqueuses, de la peau et des voies respiratoires supérieures : effets bronchospasmodiques chez l'asthmatique, augmentation des symptômes respiratoires aigus chez l'adulte (toux, gêne respiratoire), altération de la fonction respiratoire chez l'enfant (baisse de la capacité respiratoire, excès de toux ou de crise d'asthme).
Monoxyde de carbone : CO	Sources anthropiques : combustion incomplète (moteurs de voitures à essence, foyers de combustion mal réglés).	Production de l'ozone troposphérique. Effet de serre en se transformant en dioxyde de carbone (CO ₂).	Prend la place de l'oxygène sur l'hémoglobine → manque d'oxygénation de l'organisme. A doses importantes et répétées : céphalées, vertiges, asthénie, vomissements. Exposition prolongée et élevée : mortel ou séquelles neuropsychiques irréversibles.
Ozone : O₃	Sources naturelles : concentrations dans la troposphère (entre 0 et 10 km) faibles. La plus grande partie des teneurs présentes résulte donc de l'activité humaine. Polluant secondaire (pas émis directement dans l'atmosphère). Polluants primaires précurseurs de l'ozone (oxydes d'azote, COV) permettent la production d'O ₃ . Transport sur de grandes distances.	Altération de la photosynthèse et de la respiration des végétaux. Exposition à O ₃ : nécroses chez les végétaux les plus sensibles.	Gaz agressif qui pénètre facilement jusqu'aux voies respiratoires les plus fines. Irritations oculaires, toux et altérations pulmonaires principalement chez les enfants et les personnes asthmatiques. Effets augmentés par l'exercice physique.
Oxydes d'Azote : NO_x	Nature : oxygène + azote de l'air + source de chaleur importante (cheminée, moteur, chauffage...). Le NO _x assez instable, se transforme rapidement en dioxyde d'azote (NO ₂) à l'aide des oxydants présents dans l'air (comme O ₃). Sources anthropiques : trafic routier (60 %). Diminution depuis l'arrivée des pots catalytiques mais forte augmentation du trafic. Sources naturelles : volcans, océans, décomposition biologique et éclairs.	Formation de O ₃ troposphérique. Atteinte de la couche d'ozone stratosphérique. Augmentation de l'effet de serre. Pluies acides Pollution photooxydante. Pouvoir nutritif : à long terme : déséquilibre nutritif dans le sol qui se répercute par la suite sur les végétaux.	Altération de la fonction pulmonaire et augmentation des risques de troubles respiratoires. Pénètre dans les voies respiratoires profondes, fragilise la muqueuse pulmonaire face. Hyperréactivité bronchique chez les asthmatiques.
Composés Organiques Volatils (COV) : exemple du Benzène	Sources anthropiques : émis par évaporation des bacs de stockage pétroliers, remplissage des réservoirs automobiles, de composés organiques provenant des procédés industriels ou de la combustion incomplète des combustibles, de solvants émis lors de l'application des peintures, des encres, le nettoyage des surfaces métalliques et des vêtements, de composés organiques émis par	Rôle important dans les mécanismes de formation de l'ozone. Il entre également en jeu dans les processus de l'effet de serre.	Gêne olfactive, irritation, diminution de la capacité respiratoire. Risques d'effets mutagènes et cancérogènes (benzène, formaldéhyde).
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	Nature : ensemble des substances composées de 2 à 6 cycles aromatiques. Produits par la combustion incomplète ou par la pyrolyse. Sources anthropiques : émis par le trafic automobile (véhicules essence non catalysés et diesel) et les installations de chauffage au bois au charbon ou au fioul. Ils se fixent sur les particules en suspension, notamment les suies. Le benzo(a)pyrène est généralement choisi comme traceur.		Très liposolubles, les HAP sont absorbés par les poumons, l'intestin et la peau et rapidement métabolisés au niveau du foie.
Eléments Traces Métalliques	Nature : arsenic, cadmium, nickel et plomb. Sources anthropiques : raffinage, métallurgie, transformation d'énergie et incinération des déchets. Présence sous forme solide associée aux particules fines en suspension.		Accumulation dans l'organisme pouvant conduire à des niveaux de concentrations toxiques. Effets toxiques : intoxications rénales, attaque du système nerveux, cancérogènes (arsenic et nickel).

1.3. Réglementation relative aux polluants atmosphériques

1.3.1. Législation au niveau mondial

Les lignes directrices de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) concernant la qualité de l'air, publiées en 1987 et mises à jour en 2005 visent à informer les responsables de l'élaboration des politiques et à fournir des cibles appropriées à toute une série d'actions à mener pour la prévention de la pollution atmosphérique dans les différentes parties du monde. Ces lignes directrices s'appliquent au monde entier.

1.3.2. Législation au niveau européen

Dans le but d'améliorer globalement la qualité de l'air, l'Union Européenne a pris des directives concernant :

- les plafonds d'émissions nationaux pour certains polluants à l'origine des phénomènes d'acidification, d'eutrophisation et de pollution photochimique ;
- les émissions des sources fixes (grandes installations de combustion, incinérateurs de déchets municipaux, dispositifs de transport et stockage des produits pétroliers...);
- les émissions de sources mobiles (voitures particulières, poids lourds, deux-roues...);
- la qualité des carburants (contenu en soufre, benzène, plomb...);
- les normes de qualité de l'air.

L'approche et la stratégie générale du cinquième programme d'action pour l'environnement, approuvé le 1^{er} février 1993, a pour objectif le non-dépassement des charges et niveaux critiques d'acidification dans la Communauté Européenne. Ce programme exige que toute personne soit protégée de façon efficace contre les risques pour la santé liés à la pollution de l'air et que les niveaux tolérés de pollution prennent en compte la protection de l'environnement.

La Directive 96/62/CE du 27 septembre 1996 concernant l'évaluation et la gestion de la qualité de l'air ambiant, adoptée par le Conseil Européen le 17 septembre 1996 dans

le cadre d'une refonte en profondeur des réglementations européennes concernant la qualité de l'air, vise notamment à :

- **établir des objectifs de qualité de l'air dans l'Union Européenne** afin de mieux protéger la santé humaine et l'environnement. Elle vise directement les polluants suivants : 5 polluants réglementés (dioxyde de soufre (SO₂), particules en suspension, dioxyde d'azote (NO₂), plomb et ozone (O₃)) et 7 substances ou familles de polluants non encore réglementées jusqu'alors (benzène, monoxyde de carbone (CO), Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), cadmium, arsenic, nickel et mercure) ;
- **accroître l'harmonisation des procédures d'évaluation de la qualité de l'air** dans les différents États membres ;
- **fournir davantage d'informations au grand public ;**
- **améliorer la qualité de l'air dans les zones où elle est dégradée** et empêcher sa détérioration dans les zones où elle est acceptable.

Directive 1999/30/CE du 22 avril 1999 relative à la fixation de valeurs limites pour l'anhydride sulfureux, le dioxyde d'azote et les oxydes d'azote, les particules et le plomb dans l'air ambiant.

Directive 2000/69/CE du 16 novembre 2000 fixant des valeurs limites pour le benzène et le monoxyde de carbone respectivement pour 2010 et 2005 dans l'air ambiant.

Directive 2002/3/CE du 12 février 2002 relative à l'ozone dans l'air ambiant.

Directive 2004/107/CE du 15 décembre 2004 concernant l'arsenic, le cadmium, le mercure, le nickel et les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant.

1.3.3. Législation au niveau français

Le droit de l'environnement, en constante évolution, est constitué de législations d'origines et de périodes différentes. Il a été décidé en 1992 de lui assurer un accès plus

aisé et une cohérence dans le cadre du « Code de l'Environnement », version consolidée au 20 octobre 2013, découpé en six livres.

Trois d'entre eux concernent notamment les polluants atmosphériques :

- Au livre I^{er} : un renvoi au code des douanes est effectué en ce qui concerne la taxe générale sur les activités polluantes (TGAP) qui a rendu caducs les nombreux textes fondant les diverses écotaxes (dont la taxe sur les rejets de polluants atmosphériques) ;
- Au livre II, le titre II « Air et atmosphère » procède principalement à la codification de la loi n°96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air ;
- Au livre V, le titre I correspond aux dispositions de la loi n°76-663 du 19 juillet 1976 relative aux installations classées pour la protection de l'environnement qui constitue le cœur du dispositif légal de prévention des risques et des pollutions engendrées par les activités industrielles.

Chaque État membre doit transposer en droit national les Directives Européennes et mettre en place les mesures permettant de respecter les plafonds d'émission nationaux.

Au niveau français, ces dispositifs se déclinent en Arrêtés, Décrets, Plans de Protection de l'Atmosphère (PPA), Plan National Santé – Environnement (PNSE) :

- **Arrêté du 10 janvier 2000** relatif à l'indice de qualité de l'air. Ce texte traite du mode de détermination de l'indice de qualité de l'air et du mode de calcul des indices relatifs respectivement au SO₂, NO₂, O₃ et aux particules en suspension.
- **Décret n°2002-213 du 15 février 2002** porte sur la surveillance de la qualité de l'air ambiant et de ses effets sur la santé et l'environnement, les objectifs de qualité de l'air, les seuils d'alerte et les valeurs limites. Les polluants visés sont le NO₂, les particules fines et en suspension, le plomb, le SO₂, O₃, CO et le benzène.

- **Les Plans de Protection de l'Atmosphère** (code de l'environnement 2008, articles R222-13 à R222-36). Ils visent à réduire les émissions de polluants atmosphériques et précisent les objectifs qui doivent permettre de ramener les niveaux de concentrations en polluants dans l'atmosphère à un niveau inférieur aux valeurs limites. Les PPA s'imposent dans les agglomérations de plus de 250 000 habitants et dans les zones où les valeurs limites de qualité de l'air sont dépassées ou risquent de l'être. Élaborés par le préfet, ils doivent être révisés tous les cinq ans.

- **Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010** correspondant à la transposition de la directive 2008/50/CE de la Commission Européenne du 21 mai 2008 qui fixe différentes normes :
 - **objectif de qualité** : niveau à atteindre à long terme et à maintenir, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble ;
 - **valeur cible** : niveau à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné, et fixé afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou l'environnement dans son ensemble ;
 - **valeur limite** : niveau à atteindre dans un délai donné et à ne pas dépasser, et fixé sur la base des connaissances scientifiques afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble ;
 - **seuil d'information et de recommandation** : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine de groupes particulièrement sensibles au sein de la population et qui rend nécessaire l'émission d'informations immédiates et adéquates à destination de ces groupes et des recommandations pour réduire certaines émissions ;
 - **seuil d'alerte** : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de la population ou la dégradation de l'environnement, justifiant l'intervention de mesures d'urgence.

Cinq polluants gazeux sont réglementés par ce dispositif pour la protection de la santé humaine : NO₂, O₃, SO₂, CO et le benzène.

Les concentrations atmosphériques des particules en suspension ont historiquement été réglementées par la mesure des « PM₁₀ ». Cependant, le décret n°2010-1250 fixe en plus « *les normes à appliquer pour les particules « PM_{2,5} », jugées plus préoccupantes pour la santé que les particules « PM₁₀ », parce qu'elles pénètrent plus profondément dans les poumons en raison de leur petite taille et qu'elles s'accumulent dans l'organisme* ».

A noter également que des valeurs cibles de concentration, calculées par rapport au contenu total des « PM₁₀ », ont été définies à partir de 2013 pour le benzo[*a*]pyrène (B[*a*]P, C₂₀H₁₂), utilisé comme « *traceur du risque cancérogène lié aux hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant* », l'arsenic (As), le cadmium (Cd) et le nickel (Ni). Ces normes, associées aux valeurs préexistantes pour le plomb (Pb), portent à quatre le nombre de métaux et métalloïdes, anciennement qualifiés de métaux lourds, dont la concentration atmosphérique est réglementée.

- **Plan National Santé - Environnement 2009 – 2013 (PNSE)**. Celui-ci se décompose en deux axes, visant à « *réduire les inégalités environnementales* » et à « *réduire les expositions responsables de fort impact sur la santé* ».

La réduction des inégalités environnementales est une nécessité, car certaines zones du territoire sont particulièrement marquées par des activités polluantes passées ou actuelles, et nécessitent donc un suivi particulier. Ces régions, qualifiées de « *points noirs environnementaux* », devraient être identifiées par l'application de l'action 32 du PNSE2 : « *identifier et gérer les zones géographiques pour lesquelles on observe une surexposition à des substances toxiques* ».

Parmi les 58 actions du PNSE2, sept visent à une réduction des émissions atmosphériques de substances toxiques. Ainsi, l'action 5 du PNSE2 porte sur la réduction des rejets de différents composés ou familles de composés toxiques dans l'air et l'eau, à savoir :

- le benzène et les Composés Organiques Volatils (COV),
- les HAP,
- les polychlorobiphényles et dioxines,
- l'arsenic,
- le mercure,
- les solvants chlorés.

L'action 7 a quant à elle pour objectif une amélioration des connaissances sur l'exposition aux pesticides, et notamment la contamination du milieu aérien.

Les actions 1 à 4 s'intéressent spécifiquement à la problématique des particules atmosphériques. En effet, ces actions consistent en la mise en œuvre du plan « Particules », ayant pour objectif de réduire de 30 % les concentrations moyennes de particules fines dans l'environnement. Plus spécifiquement, l'action 1 vise à diminuer les émissions de particules du secteur domestique, alors que l'action 2 cible les secteurs industriels et agricoles. L'action 3 vise à mieux réguler la mobilité et réduire les émissions atmosphériques unitaires de chaque mode de transport et l'action 4 a pour objectif d'améliorer la connaissance sur les particules.

Tableau 2 : Valeurs réglementaires françaises relatives aux polluants atmosphériques (d'après Legifrance 2010/1250). *PM* : Particulate Matter ; *B[a]P* : Benzo[a]Pyrène.

	Objectif Qualité	Valeur cible	Valeur limite	Seuil info. & recommandation	Seuil alerte
NO ₂	40 µg/m ³ (an)		40 µg/m ³ (an) 200 µg/m ³ (h) <i>max 18 fois / an</i>	200 µg/m ³ (h)	400 µg/m ³ (h) <i>plus de 3h</i> 200 µg/m ³ (h) <i>sur 3 jours</i>
O ₃	120 µg/m ³ (8h)	120 µg/m ³ (8h) <i>max 25 fois / an</i>		180 µg/m ³ (h)	240 µg/m ³ (h)
SO ₂	50 µg/m ³ (an)		350 µg/m ³ (h) <i>max 24 fois / an</i> 125 µg/m ³ (jour) <i>max 3 fois / an</i>	300 µg/m ³ (h)	500 µg/m ³ (h) <i>plus de 3h</i>
CO			10 mg/m ³ (8h)		
C ₆ H ₆	2 µg/m ³ (an)		5 µg/m ³ (an)		
PM ₁₀	30 µg/m ³ (an)		40 µg/m ³ (an) 50 µg/m ³ (jour) <i>max 35 fois / an</i>	50 µg/m ³ (jour)	80 µg/m ³ (jour)
PM_{2.5}	10 µg/m³ (an)	20 µg/m³ (an)	2012 : 27 µg/m³ (an) 2015 : 25 µg/m³ (an)		
B[a]P		2013 : 1 ng/m ³ (an) <i>contenu des PM₁₀</i>			
As		2013 : 6 ng/m ³ (an) <i>contenu des PM₁₀</i>			
Cd		2013 : 5 ng/m ³ (an) <i>contenu des PM₁₀</i>			
Ni		2013 : 20 ng/m ³ (an) <i>contenu des PM₁₀</i>			
Pb	0,25 µg/m ³ (an)	0,5 µg/m ³ (an)			

1.4. Origine des particules atmosphériques

La complexité des aérosols atmosphériques vient en grande partie du fait qu'il existe une multitude de sources et de procédés de formation.

Les aérosols atmosphériques ont 3 origines principales:

- les aérosols primaires rejetés directement dans l'atmosphère ;
- les aérosols secondaires résultant de transformations chimiques à partir des polluants gazeux présents dans l'atmosphère ;
- les aérosols déposés au sol et remis en suspension.

Ces différents modes de formation déterminent la composition chimique et les propriétés physiques et optiques de l'aérosol. Ainsi, les sources primaires émettent généralement des particules plus grossières, tandis que les sources secondaires engendrent essentiellement les particules les plus fines (Figure 2).

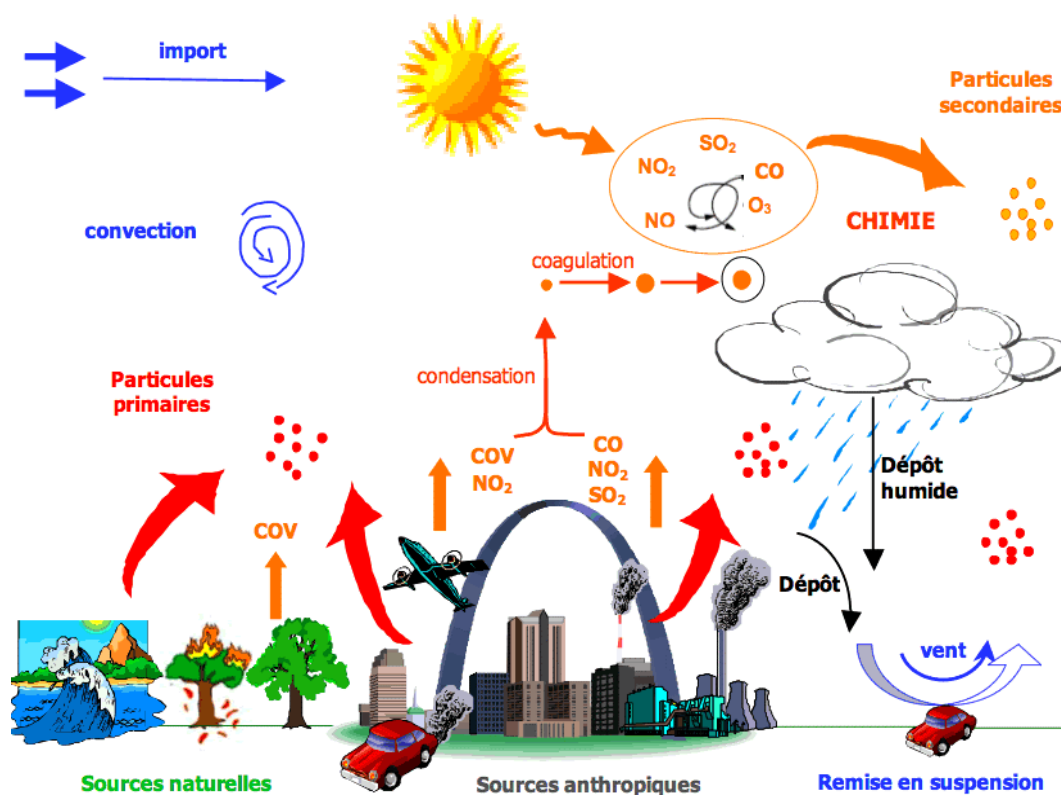


Figure 2 : Représentation schématique des principales sources de particules atmosphériques (adapté de AIRPARIF, 2011).

1.4.1. Mécanismes de formation des particules

Les mécanismes de formation des particules aboutissent à une distribution granulométrique des aérosols selon 3 modes principaux (Whitby and Cantrell, 1976) (Figure 3) :

- le **mode nucléation**, contient les particules ultrafines (diamètre $< 0,1 \mu\text{m}$). Bien que le plus grand nombre de particules atmosphériques apparaisse dans le mode nucléation, ces particules contribuent peu à la masse totale de particules en raison de leur très petite masse.
- le **mode accumulation** ($0,1 \mu\text{m} < \text{diamètre particules} < 2,5 \mu\text{m}$) contribue de façon majeure à la surface et à la masse totale des aérosols. Le mode accumulation est appelé ainsi car les procédés d'élimination atmosphériques sont moins efficaces dans cette gamme de tailles. Ces fines particules peuvent rester en suspension dans l'atmosphère pendant des jours voire des semaines.

Liés par des réactions de condensation et de coagulation, les modes de nucléation et d'accumulation forment le groupe des particules fines fortement impliquées dans la réactivité atmosphérique.

- le **mode sédimentation** ou grossier (diamètre particules $> 2,5 \mu\text{m}$) contribue peu à la concentration en nombre des particules mais contribue de façon notable à la masse. Leur durée de vie atmosphérique est faible, de quelques heures à quelques jours.

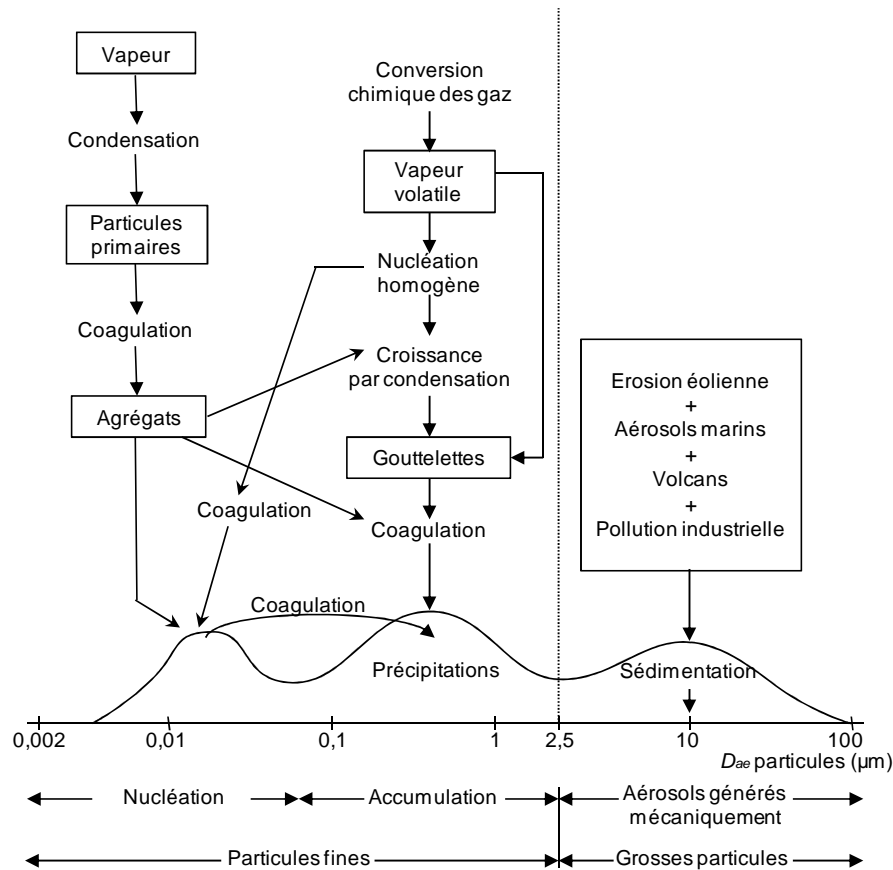


Figure 3 : Représentation schématique de la distribution granulométrique des aérosols et de leurs mécanismes de formation et de dépôt (adapté de Whitby and Cantrell, 1976).

D_{ae} : Diamètre aérodynamique.

1.4.2. Particules primaires

Les particules primaires sont directement émises dans l'atmosphère par les activités humaines ainsi que par des sources naturelles. La fraction grossière des particules primaires est essentiellement formée par des procédés mécaniques tels que l'érosion. Les plus fines sont émises soit directement sous forme solide, soit sous forme de vapeurs qui condensent très rapidement pour former des particules ultrafines.

1.4.2.1. Sources naturelles

Il existe trois sources principales d'aérosols primaires naturels (Masclat and Cahier, 1998).

- la **source terrigène** : les particules sont générées par l'érosion des sols sous l'action du vent, notamment dans les régions désertiques.

- la **source marine** : sous l'action des vagues, des gouttelettes d'eau sont projetées dans l'atmosphère. Après évaporation de l'eau de mer, les sels marins se retrouvent dans l'atmosphère et constituent des aérosols, dont la composition est proche de celle de l'eau de mer.
- la **source biogénique** : l'aérosol biogénique provient de l'émission directe par les plantes d'hydrocarbures lourds tels que les terpènes, de pollens, de spores, ainsi que des débris végétaux.
- De grandes quantités d'aérosols sont également émises lors des éruptions volcaniques, mais cela reste une source épisodique de particules.

1.4.2.2. Sources anthropiques

Le Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) estime les émissions annuelles primaires de particules PM_{2,5} à 173 000 tonnes en France pour l'année 2011 (CITEPA, 2012).

Les émissions proviennent de tous les secteurs d'activité qui sont par ordre d'importance en 2011 (Figure 4) :

- le résidentiel / tertiaire avec 45 % des émissions totales de la France métropolitaine,
- l'industrie manufacturière et traitement des déchets (24 %),
- le transport routier (18 %),
- le secteur de l'agriculture / sylviculture (9 %),
- la distribution et la transformation d'énergie (2 %),
- les autres transports (hors routier) (2 %).

Cette répartition a relativement peu évolué entre 1990 et 2011, le secteur résidentiel / tertiaire reste le premier secteur émetteur de PM_{2,5}. Au sein de ces différents secteurs, les émissions proviennent, d'une part, de la combustion du bois majoritairement domestique ainsi que, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul et, d'autre part, de l'exploitation des carrières, des chantiers et BTP et enfin des labours.

Sur la période 1990-2011, les émissions ont été réduites de 58 % (-239 kt), malgré l'année 1991 particulièrement froide, qui constitue une année exceptionnellement élevée en émissions de PM_{2.5} (maximum observé sur la période étudiée) du fait, en particulier, d'une forte consommation de bois dans le secteur résidentiel / tertiaire.

Sur la période étudiée, une baisse plus ou moins importante est observée dans tous les secteurs. Cette baisse a plusieurs origines dont :

- l'amélioration des performances des techniques de dépoussiérage dans de nombreux secteurs de l'industrie manufacturière (sidérurgie, verrerie, etc.) ;
- l'amélioration des technologies pour la combustion de la biomasse (impact dans le secteur résidentiel/tertiaire) ;
- l'arrêt de l'exploitation des mines à ciel ouvert en 2002 et des mines souterraines en 2004 (impact dans le secteur de la transformation d'énergie).

Pour l'année 2011, en plus des raisons expliquées précédemment, le climat très doux de cette année est également responsable de la baisse des consommations d'énergie dans les secteurs du résidentiel / tertiaire et de la transformation d'énergie.

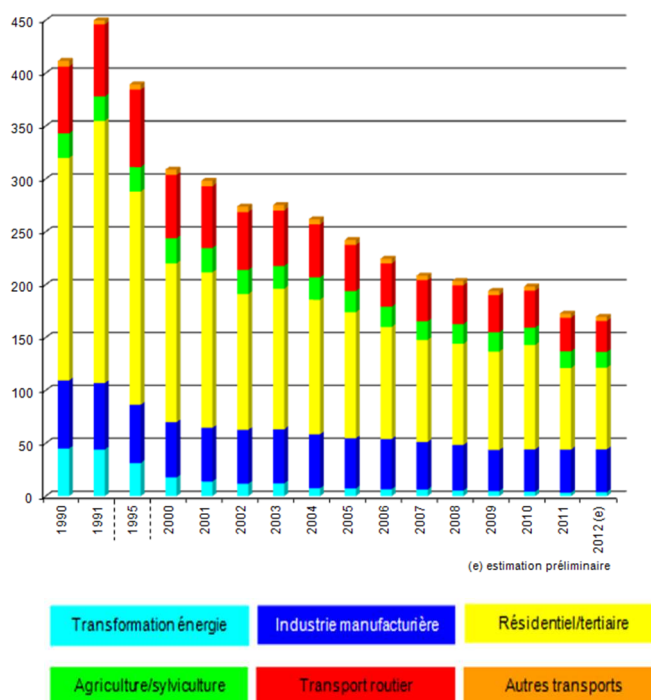


Figure 4 : Emissions de PM_{2.5}, en kilotonnes et par secteur, en France métropolitaine (données CITEPA, 2012).

1.4.3. Particules secondaires

Les particules secondaires ne sont jamais émises directement dans l'atmosphère : elles résultent de la transformation des polluants gazeux présents dans l'atmosphère, tels que le NO_2 , SO_2 , NH_3 et les COV. Les vapeurs gazeuses émises se condensent et forment des particules de très petite taille, qui grossissent par coagulation ou fixation de la vapeur d'eau. Ceci s'accompagne souvent d'une oxydation photochimique des composés, sous l'action du soleil (Whitby and Cantrell, 1976).

Les trois espèces principales d'aérosols secondaires sont (Figure 5) :

- les sulfates, issus de l'oxydation du SO_2 en acide sulfurique (H_2SO_4) ; on distingue les sulfates marins issus de l'oxydation du diméthylsulfure produit par les vagues, et les sulfates résultant de la conversion et de l'oxydation du SO_2 anthropique émis par l'industrie et les centrales thermiques.
- les nitrates, résultant de l'oxydation du dioxyde d'azote NO_2 en acide nitrique (HNO_3). Cette réaction peut s'effectuer en phase gazeuse, le nitrate étant alors associé à l'ammonium (NH_4^+). Elle peut aussi s'effectuer dans la fraction grossière lorsque le nitrate est associé à des sels marins (Na^+) ou à des poussières calcaires (Ca^{2+}).
- les composés organiques secondaires, issus de réactions chimiques à partir des COV, émis par les sources anthropiques, mais aussi biogéniques comme les terpènes.

Cette source de particules est difficile à quantifier car la génération des particules secondaires met en jeu des mécanismes complexes, mal connus qualitativement et quantitativement. Elle dépend des émissions des polluants gazeux précurseurs, mais aussi des conditions météorologiques. Elle constitue néanmoins une source importante de particules. Elle peut en particulier donner lieu à des transports continentaux de particules et contribuer fortement au nombre de dépassement de la valeur limite journalière (Bessagnet et al., 2005). Il a ainsi été observé que la plupart des épisodes de pollution

particulaire survenant en périodes hivernale et printanière étaient liés à une augmentation de la quantité de nitrates (Harrison et al., 2004; Putaud et al., 2010).

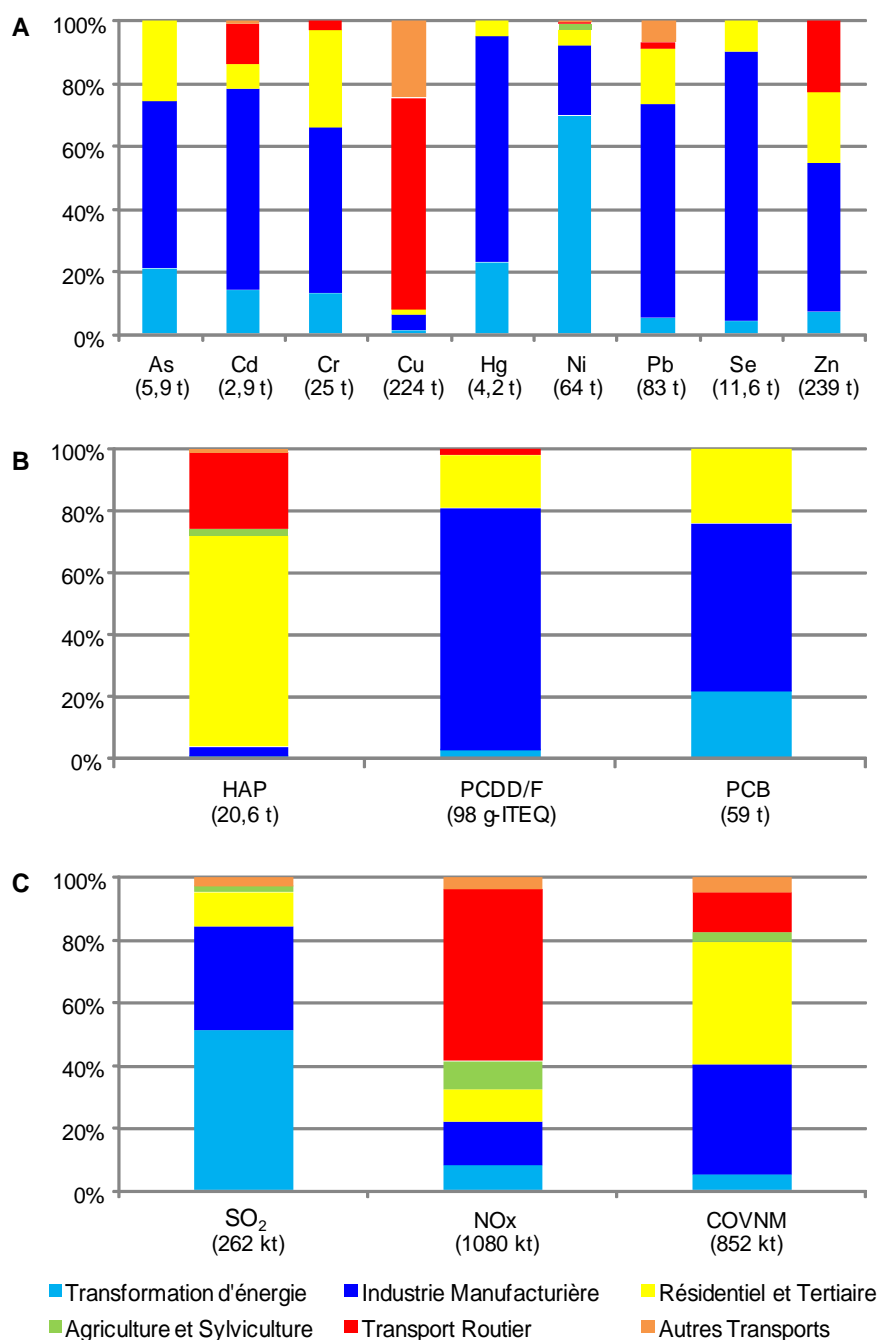


Figure 5 : Répartition par secteur d'activité des émissions de métaux (A), polluants organiques persistants (B) et précurseurs de particules secondaires (C) en France métropolitaine en 2010 (CITEPA, 2012).

COVNM : Composés Organiques Volatils Non-Méthaniques ; HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; ITEQ : Equivalent Toxique International ; NO_x : Oxydes d'azote ; PCB : PolyChloroBiphényles ; PCDD/F : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines et Furanes.

1.4.4. Dépôt, remise en suspension et transport des particules

Le temps de séjour des particules dans l'atmosphère dépend de leur taille. Par mouvement de convection, elles montent en altitude, où elles sont dispersées et diluées. Elles peuvent alors être transportées sur des distances d'autant plus longues que la particule est petite. Elles disparaissent ensuite soit par dépôt sec à la surface du sol et des végétaux, sous l'effet de la gravité, soit par dépôt humide, lors d'événement pluvieux ou neigeux (Chazette, 2004; Masclat and Cahier, 1998).

1.4.4.1. Dépôt sec

Le dépôt sec, ou sédimentation, concerne essentiellement les particules les plus grosses ($> 5 \mu\text{m}$), ainsi que celles proches de la surface, qui se redéposent rapidement (quelques heures). Elles voyagent donc sur des distances assez courtes, généralement inférieures à 500 kilomètres. Lors d'événements particuliers tels que les tempêtes de sable, elles peuvent néanmoins être transportées sur plusieurs milliers de kilomètres, comme les poussières sahariennes que l'on retrouve parfois en Europe du Nord.

En revanche, les particules fines peuvent rester en suspension dans l'atmosphère pendant plusieurs jours et être transportées en altitude sur de très longues distances. Les particules présentant les temps de séjour les plus longs sont celles dont le diamètre est compris entre 0,1 et $1 \mu\text{m}$. Des niveaux élevés de polluants atmosphériques d'origine anthropique sont ainsi régulièrement enregistrés en Arctique, notamment en hiver et au printemps, où les conditions météorologiques favorisent le transport longue distance et conduisent à la formation d'une brume (« The Arctic Haze ») (Stohl and al., 2007).

1.4.4.2. Dépôt humide

Le dépôt humide est la principale voie d'élimination des particules, selon deux modes. Les particules fines, en particulier celles contenant des composés hygroscopiques, servent de noyau de condensation sur lesquels se forment les gouttelettes de nuage. Lorsque ces gouttelettes grossissent suffisamment pour qu'il pleuve, les particules sont

éliminées avec les précipitations. Lorsqu'il pleut, les gouttes d'eau entraînent également les particules les plus grosses.

1.4.4.3. Remise en suspension

Une fois déposées, les particules peuvent ensuite être remises en suspension sous l'action du vent. Dans certaines régions d'Europe marquées par un climat sec et venteux, comme le pourtour méditerranéen, la remise en suspension et le transport de poussières désertiques peuvent constituer une source importante de particules et contribuer sensiblement au nombre de dépassements de la valeur limite journalière (Dordevic et al., 2004). En zone urbaine, la remise en suspension s'effectue également sous l'action du trafic routier et représente une source importante de particules à proximité d'axes routiers à fort trafic. Selon les études, il est ainsi estimé que la remise en suspension contribue de 20 à 50% aux émissions de particules spécifiquement liées au trafic routier (Thorpe et al., 2007). Dans les pays scandinaves, cette proportion peut aller jusqu'à 90 %, en raison de l'utilisation de pneus cloutés en période hivernale et du salage des routes.

Tout comme la formation des aérosols secondaires, la remise en suspension de particules est une source difficilement quantifiable et sur laquelle il est de plus très difficile d'agir. C'est pour cette raison que dans les directives européennes, il est possible de soustraire les évènements naturels au calcul de nombre de dépassements de la valeur limite journalière. Cette question reste cependant discutée, car les poussières désertiques peuvent être transportées jusque dans des zones urbaines densément peuplées, et ces poussières crustales, principalement composées d'aluminosilicates riches en fer, peuvent contenir des éléments toxiques pour la santé humaine (Dordevic et al., 2004).

1.5. Caractéristiques physico-chimiques des particules

1.5.1. Propriétés physiques

1.5.1.1. Taille

Les particules atmosphériques sont classées selon leur Diamètre aérodynamique équivalent (D_{ae}), qui correspond au diamètre de la particule sphérique d'une masse volumique de 1 g / cm^3 qui possède la même vitesse limite de chute dans l'air que la particule considérée. Sont ainsi distinguées 4 classes granulométriques :

- les particules grossières, dont le D_{ae} est supérieur à $10 \text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{>10}$),
- les grosses particules, ayant un D_{ae} inférieur à $10 \text{ }\mu\text{m}$ (PM_{10}),
- les particules fines, dont le D_{ae} est inférieur à $2,5 \text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$),
- les particules ultrafines, appelées nanoparticules si elles sont manufacturées, ayant un D_{ae} inférieur à $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0,1}$).

Hormis pour les particules grossières ($\text{PM}_{>10}$), chaque classe granulométrique englobe les particules de la classe inférieure (Bliefer and Perraud, 2009).

Des analyses de la composition des PM montrent qu'elles diffèrent en fonction de la taille des particules. Ainsi pour les plus fines, généralement des suies issues des combustions incomplètes associées au trafic, au chauffage, en particulier au bois, et aux incinérations, deux types de composants sont à prendre en considération : les composés organiques qui sont adsorbés à la surface des particules, en particulier les HAP et les métaux. Les particules Diesel font partie de cette fraction fine des PM.

1.5.1.2. Surface spécifique

La surface spécifique est une mesure qui s'applique aux solides granulaires ou particulaires et qui correspond à la surface totale par unité de masse. Elle s'oppose à la surface apparente du solide, en prenant en compte à la fois la surface individuelle de chaque grain et la surface présentée par les pores ouverts présents dans les grains. Elle peut être déterminée en mesurant la quantité de molécules de gaz qui peut être adsorbée à la surface du solide et s'exprime en m^2 / g . D'un point de vue biologique, une

comparaison pourrait être faite avec l'épithélium intestinal, où les villosités et microvillosités permettent de développer une surface beaucoup plus grande que la surface apparente, démultipliant ainsi les capacités d'absorption de l'intestin. Différents processus physiques et chimiques peuvent avoir lieu à la surface des solides, dont l'intensité est fonction de la surface spécifique. Dans un contexte d'évaluation toxicologique de particules atmosphériques, deux phénomènes liés à leur surface spécifique sont à considérer : leur réactivité de surface et leur capacité d'adsorption.

1.5.1.3. Distribution d'un aérosol

Il a été démontré que les distributions en masse, surface et nombre des particules constituant un aérosol atmosphérique en fonction de leur diamètre étaient extrêmement différentes. En effet, la surface spécifique relative d'un aérosol ainsi que le nombre de particules qu'il contient évoluent de manière inversement proportionnelle au diamètre des particules (Tableau 3). Si l'on considère un aérosol type, les PM_{2.5-10}, bien que les moins nombreuses, représentent une part importante du volume et par extension de la masse de l'aérosol, tout en ne possédant qu'une faible surface. Les PM_{0.1-2.5} sont quant à elles caractérisées par une grande surface et un volume important. Enfin, les PM_{0.1} constituent la majeure partie en nombre de l'aérosol, ainsi qu'une part non négligeable de sa surface. En revanche, elles ne représentent qu'une part extrêmement faible du volume de l'aérosol (Heintzenberg, 1989).

Tableau 3 : Comparaison, pour une masse donnée, du nombre relatif de particules et de la surface spécifique relative de l'aérosol en fonction du diamètre des particules.

Diamètre (µm)	Nombre relatif	Surface spécifique relative
10	1	1
1	10 ³	10 ²
0,1	10 ⁶	10 ⁴
0,01	10 ⁹	10 ⁶

1.5.2. Composition

1.5.2.1. Composition chimique type

D'un point de vue global, les espèces majoritairement retrouvées au sein des particules sont les ions sulfate, nitrate et ammonium, des dérivés chlorés, des espèces carbonées organiques et inorganiques, ainsi que des éléments terrigènes et biogènes. A ces espèces prépondérantes s'ajoutent des éléments à l'état de traces, tels que les métaux ou les dioxines (Harrison and Yin, 2000). La notion de traces est cependant relative et les proportions de ces différents éléments peuvent très fortement varier en fonction des sources d'émission. A titre d'exemple, Billet *et al.* ont mis en évidence des concentrations massiques en fer de 7,84 % dans des PM_{2.5} collectées à proximité de sites métallurgiques (Billet et al., 2007).

Ces données générales se confirment au niveau européen, où celles issues de 60 sites de prélèvement montrent que les principaux constituants des PM_{2.5} et des PM₁₀ sont des éléments organiques, des ions sulfate et des ion nitrate (Putaud et al., 2010). Cependant, des différences de composition apparaissent en fonction de la classe granulométrique des particules. Ainsi, si l'on considère des particules prélevées à proximité d'axes routiers, les poussières minérales contribuent plus fortement à la composition des PM₁₀ alors que le carbone total est un élément majeur des PM_{2.5} (Putaud et al., 2010). Ces différences de composition sont à mettre en relation avec le mode de formation des particules, majoritairement « mécanique » pour les PM₁₀ alors que les PM_{2.5} sont issues de l'agrégation de particules primaires et de gaz par des processus de nucléation et de condensation (Bliefer and Perraud, 2009). Dans le cas précédemment évoqué, les PM₁₀ proviendraient en grande partie de l'érosion des routes et de la remise en suspension, alors que les PM_{2.5} seraient formées à partir des gaz d'échappement des véhicules.

1.5.2.2. Fraction biologique

La contribution de la fraction biologique à la composition des particules est souvent négligée. Cependant, les aérosols atmosphériques particuliers sont en partie composés de microorganismes, tels que des bactéries ou des champignons, ainsi que de

pollens ou de leurs fragments (Figure 6). Une étude de Glikson *et al.* montre que l'aérosol biogénique peut représenter jusqu'à 5 % des PM_{2.5-10} et qu'il est constitué majoritairement de spores fongiques dans cette gamme de taille (Glikson et al., 1995). Les champignons les plus fréquemment rencontrés appartiennent aux genres *Cladosporium* (41 à 42,5 %), *Leptosphaeria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* (Ivanovici and Tudorica, 2009; Li and Kendrick, 1995). L'abondance des spores des genres *Cladosporium* et *Alternaria* a été corrélée à plusieurs paramètres météorologiques : la température, les précipitations, la pression et l'humidité relative (Grinn-Gofron and Rapiejko, 2009). Des fragments de spores et de pollen entrent également dans la composition des PM₁, où ils sont associés à des particules minérales terrigènes et à des suies (Glikson et al., 1995). Les bactéries sont quant à elles présentes sous la forme d'agrégats ayant un D_{ae} d'environ 3 µm, plutôt que sous forme de cellules individualisées (Huffman et al., 2010).

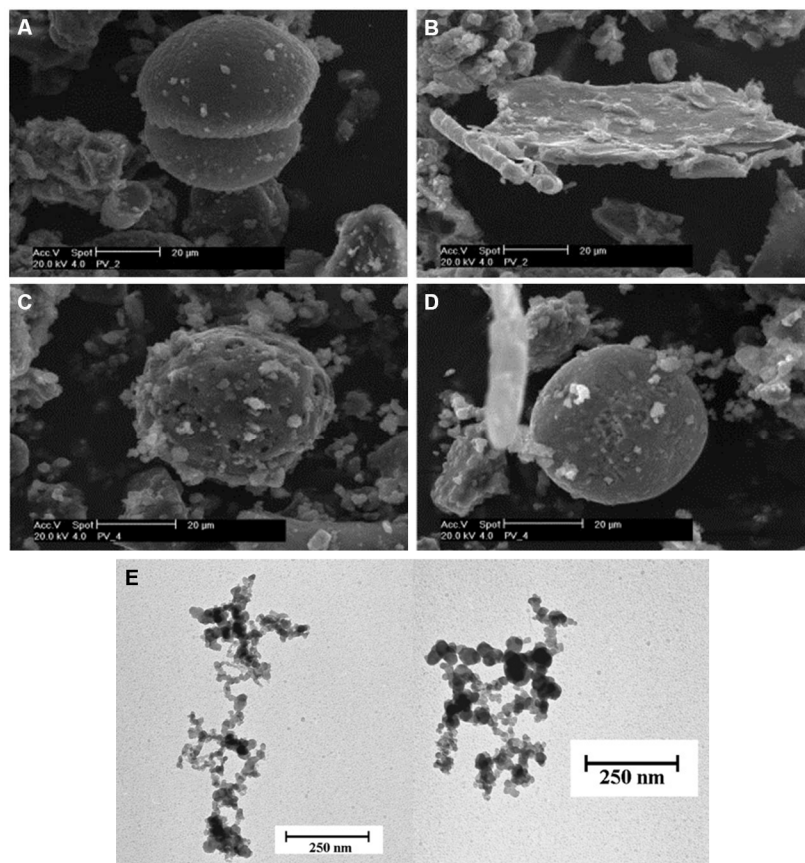


Figure 6 : Images en microscopie électronique d'une particule biologique (A), d'un phyllosilicate (B), d'une particule carbonée (C), d'une particule métallique (D) et de particules émises par un moteur diesel (E) (A-D : Nava et al., 2010 ; E : Rissler et al., 2012).

1.6. Contexte local

1.6.1. Situation du Nord-Pas-de-Calais

La région Nord-Pas-de-Calais s'étend sur 12 414 km², ce qui représente près de 2% de la superficie du territoire national. La région compte 4 038 570 d'habitants (INSEE, 2010), ce qui représente environ 6 % de la population française, répartis sur 1546 communes avec une densité de 321 habitants / km².

La surface régionale est occupée par les espaces cultivés et les prairies à hauteur de 72 % (INSEE, 2010). Les milieux naturels occupent 13 % de l'espace et les zones naturelles humides, productrices de méthane et de CO₂, ne représentent plus que 0,5% du territoire. L'agriculture régionale est donc bien développée et les puits naturels de carbone sont peu importants. La région s'intègre dans le vaste espace métropolisé à dominante urbaine de l'Europe du Nord-Ouest qui constitue la zone de peuplement la plus dense d'Europe.

Bordée par l'extrémité sud de la mer du Nord et de la Manche et située à l'ouest de la grande région des plaines d'Europe Centrale, la région est soumise à des influences météorologiques contrastées ; le climat est à tendance océanique sur le littoral et plus continentale à l'intérieur des terres.

La région Nord-Pas-de-Calais est située sur des axes de transport très empruntés et possède des infrastructures et équipements diversifiés comprenant : 1421 km de réseau ferré, 30 949 km de réseau routier (INSEE, 2010), un réseau de canaux et de fleuves canalisés de 680 km de long dont 576 km à vocation commerciale, trois ports maritimes majeurs (Grand Port Maritime de Dunkerque, port de Calais, port de Boulogne-sur-Mer) et trois aéroports (Lille-Lesquin, Le Touquet-Côte-d'Opale et Calais Dunkerque).

Par ailleurs, la région compte près de 1700 installations classées pour la protection de l'environnement soumises au régime de l'autorisation administrative qui peuvent avoir un impact sur la qualité de l'air en fonction de la nature de leurs rejets atmosphériques. Elles couvrent en très grande partie le territoire régional.

1.6.2. Situation de l'agglomération de Dunkerque

Selon les données 2010 de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE, 2010), l'agglomération dunkerquoise regroupe 259 175 habitants répartis sur 790 km², soit environ 6,5 % des habitants de la région Nord - Pas-de-Calais (INSEE, 2010). Cette zone urbaine, constituant le troisième port de France, est caractérisée par une forte présence industrielle et, de par sa localisation à l'interface France - Belgique - Royaume-Uni (tunnel transmanche), deux autoroutes très fortement fréquentées : A16 (65 000 véhicules/jour) et A25 (153 000 véhicules/jour) (données INSEE, 2006) (Figure 7A).

1.6.2.1. Composition de la zone industrielle de Dunkerque

La zone industrialo-portuaire de Dunkerque s'étend sur 7 000 hectares. La plupart des sites industriels présents sont consacrés à la métallurgie, la sidérurgie, la chimie et la pétrochimie (Figure 7B). Quatorze d'entre eux sont classés sites Seveso de haut seuil (MEDDE, 2013) et un 15ème (terminal méthanier) est en cours de construction :

- Sidérurgie : Aluminium Dunkerque, Arcelormittal Dunkerque.
- Chimie : MINAKEM SA.
- Pétrochimie : Appontements Pétroliers des Flandres Dépôt (Groupe TOTAL), Polimeri Europa France (sites Dunes), Polimeri Europa France (sites Fortelet), Ryssen Alcools SAS, Société de la Raffinerie de Dunkerque, TOTAL Raffinage France SA.
- Sites de stockage : Dépôts de Pétrole Côtiers, Rubis Terminal Mole V, Rubis Terminal Unican.
- Autres : Air Liquide France Industrie (Société des Gaz Industriels de France), BASF AgriProduction.

Ces sites sont soumis au plan de prévention des risques technologiques et se situent sur les communes de Dunkerque, Grande-Synthe, Loon-Plage, Fort-Mardyck et Saint-Pol-sur-Mer.

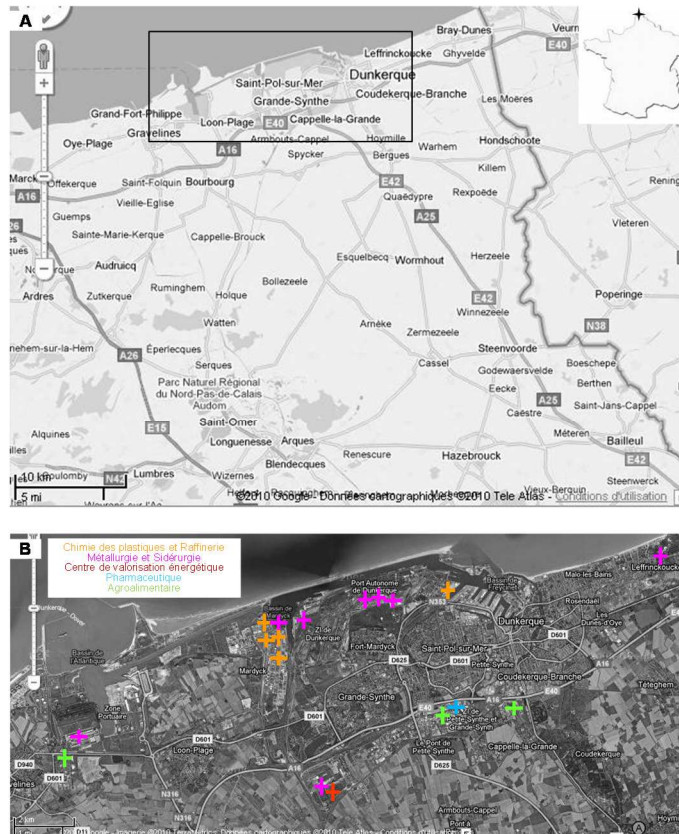


Figure 7 : Localisation de l'agglomération de Dunkerque (A) et des sites industriels (B) (Cartes GoogleMaps).

1.6.2.2. Bilan des émissions atmosphériques

En plus des implantations précédemment décrites, de nombreux sites situés à proximité de Dunkerque sont répertoriés dans le registre français des émissions polluantes (IREP). Ainsi, l'IREP recense 32 sites (hors sites d'élevage) situés à moins de 15 km de la ville de Dunkerque responsables de l'émission de substances polluantes dans l'atmosphère (IREP, 2011). Parmi ces installations, un centre de valorisation énergétique se situe à proximité de la ville (Figure 7B).

Bien que les sites industriels et les infrastructures associées soient indispensables à la vie économique de la zone, leur présence n'est pas sans conséquences pour l'environnement. En effet, la concentration des sources polluantes au niveau de la zone de Dunkerque se traduit par des niveaux d'émission en certains polluants réglementés nettement supérieurs à d'autres zones de la région, comme le montre le cadastre des émissions atmosphériques établi par ATMO Nord - Pas de Calais (ATMO-EDM, 2006) (Figure 8).

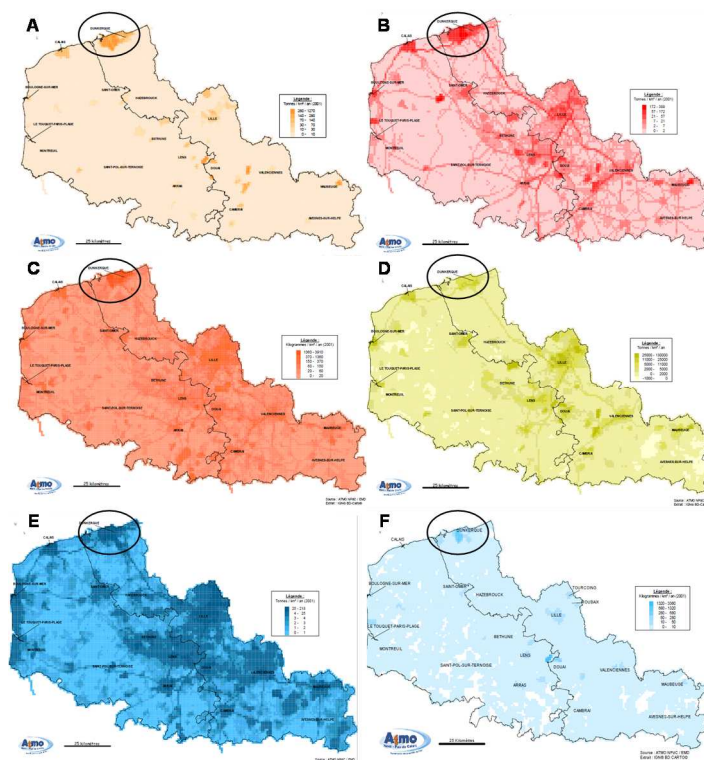


Figure 8 : Répartition dans la région Nord-Pas-de-Calais des émissions atmosphériques en SO₂ (A), oxydes d'azote (B), benzène (C), CO₂ (D), composés organiques volatiles non-méthaniques (E) et plomb (F) (ATMO-EDM, 2006).

1.6.2.3. Polluants gazeux

Les rejets régionaux de SO₂ proviennent presque exclusivement de la zone de Dunkerque, avec des niveaux d'émission généralement compris entre 140 et 280 t / km² / an et atteignant par endroits jusqu'à 1 270 t / km² / an (Figure 8A). Ces niveaux d'émission particulièrement hauts s'expliquent par la présence, dans l'agglomération dunkerquoise, de 6 des 13 principaux émetteurs de SO₂ de la région (plus de 500 t / an). Ces 6 sources ont, à elles seules, rejeté 19 401 t de SO₂ en 2009 (DREAL, 2010).

Bien que plusieurs zones d'émission de NO_x et de benzène puissent être repérées au niveau régional, leur intensité sur le territoire dunkerquois est nettement supérieure. En effet, des émissions comprises entre 172 et 399 t / km² / an de NO_x y sont retrouvées, alors qu'elles sont généralement inférieures à 172 t / km² / an dans le reste de la région (Figure 8B). De même, les émissions de benzène y atteignent 1 360 à 3 910 kg / km² / an, contre moins de 370 sur le reste du territoire (Figure 8C).

A l'inverse, les émissions de CO₂ et de Composé Organique Volatil Non-Méthanique (COVNM) sont équivalentes à celles mesurées dans d'autres zones urbaines de la région Nord - Pas de Calais (Figures 8D,E).

1.6.2.4. Particules

L'étude de la répartition des émissions de particules au niveau régional montre que seule la région de Dunkerque comprend des zones émettant plus de 29 t de particules / km² / an, avec au minimum des émissions de 4 t / km² / an (Figure 9A). L'analyse des principaux secteurs responsables de ces émissions met en évidence le rôle prépondérant joué par les activités industrielles au niveau dunkerquois (Figure 9B). Ces observations sont confirmées par les chiffres publiés par la DREAL en 2010. En effet, l'agglomération de Dunkerque héberge 5 des 9 émetteurs de plus de 100 t de particules / an, soit 2 908 t de particules émises dans la zone en 2009 (DREAL, 2010). Ces émissions représentent 62 % du total des émissions industrielles au niveau régional, pour une zone ne couvrant que 6,4 % du territoire.

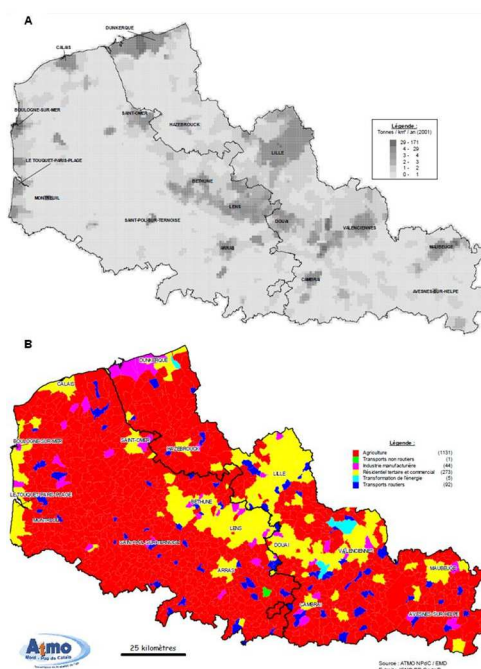


Figure 9 : Répartition dans la région Nord-Pas de Calais des émissions atmosphériques de particules en suspension tous secteurs confondus (A) et secteur majoritairement responsable des émissions de particules par commune (B) (ATMO-EDM, 2006).

2. Système respiratoire : anatomie, toxicocinétique des particules inhalées et cancer du poumon

La seconde partie de cette analyse bibliographique sera consacrée à l'étude de l'impact des particules sur l'appareil respiratoire. Nous reviendrons dans un premier temps sur l'anatomie et l'histologie du système respiratoire, afin de comprendre la toxicocinétique des particules, avant d'aborder le cancer du poumon.

2.1. Anatomie et histocytologie	31
2.1.1. Fosses nasales.....	32
2.1.2. Pharynx.....	32
2.1.3. Larynx.....	32
2.1.4. Arbre trachéo-bronchique.....	33
2.1.5. Bronchioles	33
2.1.6. Alvéoles pulmonaires	34
2.1.7. Macrophages alvéolaires.....	35
2.2. Toxicocinétique des particules atmosphériques.....	37
2.2.1. Dépôt des particules atmosphériques dans les poumons	37
2.2.2. Translocation de particules à travers les barrières biologiques.....	39
2.3. Cancer du poumon : épidémiologie, facteurs de risque et classification	41
2.3.1. Données épidémiologiques	41
2.3.1.1. Évolution de l'incidence du cancer du poumon	43
2.3.1.2. Incidence et mortalité estimée dans les régions.....	44
2.3.2. Facteurs de risque de cancer du poumon	47
2.3.2.1. Influence de l'âge	47
2.3.2.2. Rôle du statut tabagique	47
2.3.2.3. Effets des polluants	48
2.3.3. Classification histologique des cancers du poumon	49
2.3.3.1. Carcinomes pulmonaires non à petites cellules.....	49
2.3.3.2. Carcinomes pulmonaires à petites cellules.....	51
2.3.3.3. Evolution histologique.....	51

2. Système respiratoire : anatomie, toxicocinétique des particules inhalées et cancer du poumon

2.1. Anatomie et histocytologie

L'appareil respiratoire est divisé en voies aériennes supérieures et inférieures. Les voies aériennes supérieures sont situées dans la face et dans le cou et comprennent les fosses nasales (annexées à l'olfaction) et les sinus paranasaux, le pharynx (voie croisée avec l'appareil digestif), le larynx (annexé à la phonation). Les voies aériennes inférieures sont situées dans le cou et le thorax. Elles sont composées de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les voies aériennes inférieures sont extrapulmonaires au niveau de la trachée et des bronches souches et deviennent intrapulmonaires au niveau du hile (Figure 10).

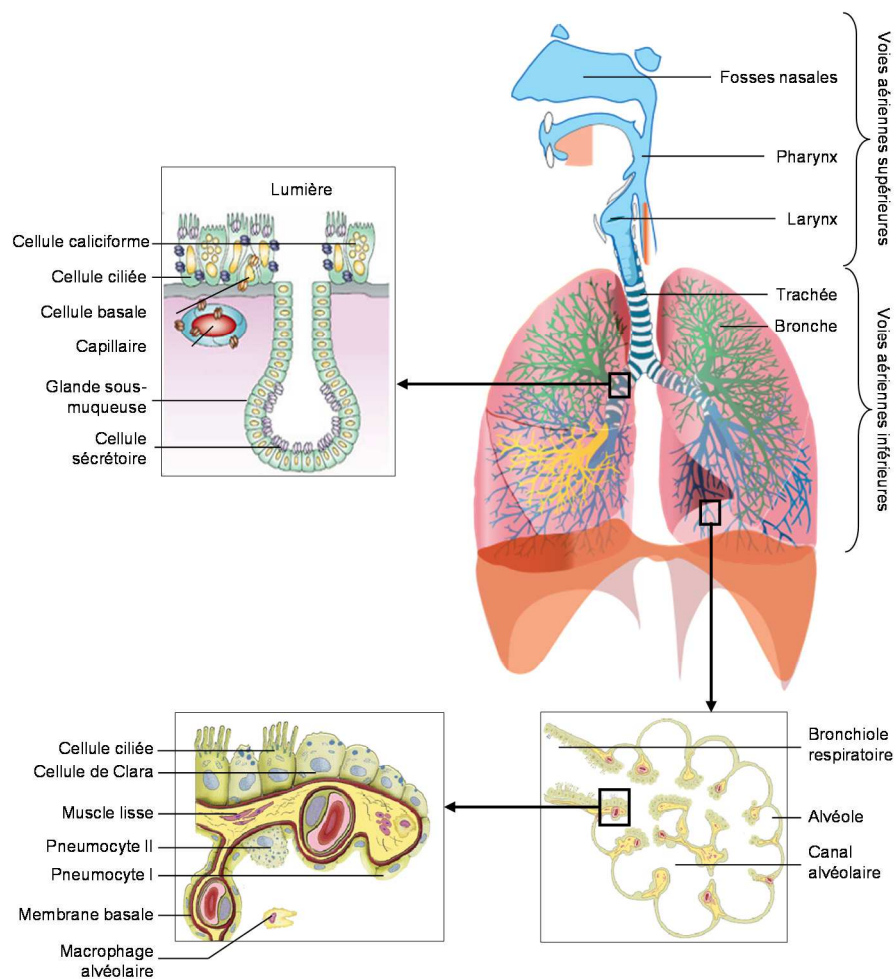


Figure 10 : Structure de l'appareil respiratoire humain et organisation cellulaire (adapté de Billet, 2008) .

2.1.1. Fosses nasales

Les fosses nasales constituent la première partie des voies respiratoires. Ce sont deux cavités séparées par une lame cartilagineuse et revêtues par deux types de muqueuse : la muqueuse pituitaire et la muqueuse olfactive. Cette dernière, située à la partie postérieure de chacune des fosses nasales, tapisse une zone de 2,5 cm². Les fosses nasales sont constituées d'os dans leur partie supérieure et deviennent cartilagineuses au niveau de la pointe.

Les fosses nasales démarrent par les narines au niveau antérieur et s'ouvrent sur le nasopharynx au niveau postérieur. Chaque fosse nasale est séparée par des cornets permettant de ralentir le flux d'air en créant des turbulences.

2.1.2. Pharynx

Le pharynx est un carrefour aéro-digestif, il sépare les voies aériennes (cavité nasale et larynx) des voies digestives.

Il est constitué de 3 segments :

- le nasopharynx ou rhinopharynx, partie supérieure en rapport avec les fosses nasales,
- l'oropharynx, partie moyenne buccale,
- l'hypopharynx, qui s'ouvre en avant sur le larynx.

2.1.3. Larynx

Le larynx est l'intermédiaire entre le pharynx et la trachée, il abrite les cordes vocales et est situé juste en dessous de la base de la langue en avant de l'hypopharynx et au-dessus de la trachée.

Il est constitué de neuf cartilages articulés entre eux, maintenus par des membranes fibreuses et des ligaments, et rendus mobiles par des muscles intrinsèques. Parmi ces cartilages, l'épiglotte est un fibrocartilage très flexible qui forme l'entrée du larynx et se rabat sur ce dernier pour empêcher le passage des aliments vers la trachée lors de la déglutition.

2.1.4. Arbre trachéo-bronchique

La trachée est un conduit fibro-musculo-cartilagineux mesurant environ 12 cm de long avec un diamètre de 2 cm, constitué de 16 à 20 anneaux cartilagineux séparés entre eux par des dépressions constituées de tissu fibro-élastique. Elle est située dans la partie antérieure et inférieure du cou et la partie supérieure du thorax. Elle fait suite au larynx et se divise en deux bronches souches ou principales au niveau de la carène dans sa partie inférieure.

Les deux poumons ne sont pas symétriques. En effet, la bronche souche gauche se divise en deux bronches lobaires, alors que la bronche souche droite se divise en trois bronches lobaires. Chaque bronche lobaire est associée à un lobe pulmonaire. Ainsi, le poumon droit est constitué des lobes supérieur, moyen et inférieur, séparés par deux scissures : la grande (ou oblique) et la petite (ou horizontale). A l'inverse, le poumon gauche ne comprend que les lobes supérieur et inférieur, séparés par la scissure oblique.

L'épithélium trachéo-bronchique est pseudo-stratifié de type respiratoire dans la trachée et les bronches principales, et contient des cellules ciliées, caliciformes et de petites cellules basales de remplacement. Cet épithélium cilié, vibratile participe à la constitution de l'escalator mucociliaire. L'efficacité de ce tapis mucociliaire comme système d'épuration dépend de l'équilibre idéal entre la qualité du mucus et du nombre de cellules ciliées (Tableau 4).

2.1.5. Bronchioles

La ramification de l'arbre bronchique aboutit à des bronchioles de 0,15 cm de diamètre, puis à des bronchioles terminales de 0,07 cm de diamètre. Leur nombre peut atteindre 65 000 (IRCP, 1994).

Chaque bronchiole terminale se divise pour donner aux moins deux bronchioles respiratoires, ces dernières portent à leur extrémité les alvéoles pulmonaires. Les bronchioles respiratoires sont au nombre de 260 000 par génération.

L'épithélium respiratoire distal devient progressivement unistratifié puis cylindrique non cilié; les cellules caliciformes s'y raréfient pour bientôt disparaître et les cellules de Clara apparaissent (Tableau 4). Elles élaborent des lipoprotéines intervenant dans la constitution du surfactant, équivalent du mucus au niveau des cellules distales. Elles sont également riches en lysosomes qui permettent la dégradation d'agents inhalés par endocytose. Elles présenteraient une très grande sensibilité à de nombreux polluants atmosphériques (Hermans and Bernard, 1996).

2.1.6. Alvéoles pulmonaires

C'est à ce niveau que se font les échanges gazeux entre l'air et le sang. Trois voies de communication entre les alvéoles sont définies : les « canaux de Martin », qui font communiquer deux bronchioles entre elles ; les « canaux de Lambert », connexions broncho-alvéolaires ayant un diamètre d'environ 30 μm ; et les « pores de Köhln », communications interalvéolaires d'un diamètre de 3 μm . Les alvéoles sont au nombre de 300 millions et représentent une surface qui varie, selon les estimations, de 80 à 140 m^2 . La taille des alvéoles est estimée à 244 μm de diamètre et 238 μm de longueur (IRCP, 1994).

Le parenchyme pulmonaire est constitué des alvéolaires pulmonaires ainsi que de veines, artères et vaisseaux lymphatiques. Le revêtement épithélial des alvéoles pulmonaires comprend des pneumocytes I et des pneumocytes II. Ces derniers synthétisent des molécules entrant dans la composition du surfactant alvéolaire. Ils ont pour autres fonctions : l'endocytose du surfactant, le recyclage et la dégradation des éléments piégés ce qui constitue une véritable fonction de détoxification.

Tableau 4 : Eléments constituant la paroi des voies respiratoires en fonction de la zone considérée.

	Fosses nasales postérieures	Pharynx	Larynx	Trachée
Epithélium	Pseudostratifié respiratoire	Pseudostratifié respiratoire ou pluristratifié épidermoïde		Pseudostratifié respiratoire
Cartilage	Oui	Non	Hyalin ou élastique	Anneaux incomplets
Muscle	Non	Strié (muscleuse)	Oui	Lisse (muscle trachéal)
Fibres élastiques	Oui	Oui	Ligament vocal	Oui

	Bronches souches	Bronches lobaires	Bronches segmentaires	Bronchioles terminales	Bronchioles respiratoires
Epithélium	Pseudostratifié respiratoire		Cylindrique cilié simple	Cubique simple	
Cartilage	Anneaux complets puis fragmentés	Plaques	Nodules	Non	
Muscle	Muscle lisse = Muscle de Reissessen				
Fibres élastiques	Abondantes				

2.1.7. Macrophages alvéolaires

Les progéniteurs des macrophages alvéolaires (promonocytes) sont médullaires, comme les autres monocytes de l'organisme. Ils deviendront monocytes lors de leur passage dans la circulation systémique. Les monocytes sanguins quittent la circulation sanguine au bout de 3-4 jours pour passer dans les tissus pulmonaires où ils séjournent pendant 1 à 3 mois. L'interstitium n'est pas un lieu de maturation des précurseurs des macrophages. L'origine des macrophages alvéolaires dépend donc de l'apport des monocytes sanguins.

Les macrophages alvéolaires sont nombreux (environ 23 milliards de cellules) et pourtant ne représentent que 2 % de toutes les cellules du parenchyme pulmonaire. Boorman et al., (1980) retrouvent 0,36 macrophage par alvéole.

Ces cellules ont quatre caractéristiques majeures :

- une grande mobilité
- un haut pouvoir de phagocytose
- la présence de nombreux antigènes et récepteurs de membrane

- une sécrétion de nombreux médiateurs (thromboxane, prostaglandines, PAF (Platelet Activating Factor), cytokine pro et anti-inflammatoires.

De ces caractéristiques découle un rôle important dans la défense de l'appareil respiratoire. Ils participent à l'élimination des particules inhalées, à l'élimination des germes grâce à leur pouvoir bactéricide, à la présentation de l'antigène dans la réponse inflammatoire spécifique, au recrutement et à l'activation d'autres types cellulaires et interagissent avec d'autres cellules réparatrices de l'alvéole (Figure 11).



Figure 11 : Coupe histologique d'alvéole pulmonaire de porc, mettant en évidence des macrophages alvéolaires (microscopie électronique x1000, coloration trichome de masson) (Université Pierre et Marie Curie, 2009).

2.2. Toxicocinétique des particules atmosphériques

Les particules fines et ultrafines constituent la fraction dite respirable, c'est-à-dire celle qui pénètre dans les poumons jusqu'aux voies respiratoires inférieures et aux alvéoles. Cependant, les études de déposition montrent que, pour la fraction la plus fine à l'échelle nanométrique, ce dépôt peut se faire majoritairement au niveau du nasopharynx et des voies respiratoires supérieures (Oberdörster et al., 2005). Si elles sont négligeables en masse (1 à 8 %), les particules ultrafines représentent en nombre jusqu'à 80 % de l'aérosol urbain alors que leur importante surface spécifique leur confère une réactivité accrue donc une activité biologique plus grande que celle des grosses particules de même composition chimique.

Après leur émission dans l'atmosphère, les particules surface réagissent avec des gaz tels que les COV, fixent des molécules biologiques comme des endotoxines (provenant de la paroi des bactéries) ou des allergènes (provenant de grains de pollen ou de spores fongiques). Ces différentes molécules adsorbées vont pénétrer dans les voies aériennes avec les particules et induire elles-mêmes des réponses biologiques : c'est l'effet « cheval de Troie ».

Il a été démontré que les molécules formant le cœur de la particule ou adsorbées à sa surface pouvaient devenir biodisponibles dans le poumon. Par exemple, les HAP peuvent être transformés en métabolites actifs susceptibles d'effets toxiques voir cancérogènes alors que les métaux peuvent induire un stress oxydant à l'origine d'une réponse inflammatoire.

2.2.1. Dépôt des particules atmosphériques dans les poumons

Le diamètre aérodynamique équivalent (D_{ae}) conditionne le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire. Les particules, ayant un $D_{ae} > 10 \mu\text{m}$, s'impactent au niveau de l'oropharynx puis sont dégluties. Les particules dites « respirables » ($D_{ae} < 10 \mu\text{m}$; PM_{10}) pénètrent plus profondément dans l'appareil respiratoire. Les $\text{PM}_{2,5-10}$ pénètrent dans l'arbre trachéo-bronchique et atteignent les bronchioles terminales. Les particules fines ($\text{PM}_{2,5}$) englobant les particules ultrafines ($\text{PM}_{0,1}$) peuvent atteindre les alvéoles.

La déposition des particules dans l'appareil respiratoire dépend essentiellement de trois mécanismes : la sédimentation pour les particules les plus grosses, l'impaction au niveau des bifurcations bronchiques, et la diffusion pour les particules les plus fines (Figure 12). La taille des particules détermine donc leur site de déposition dans l'appareil respiratoire au niveau de trois régions majeures de dépôt : les régions naso-pharyngée, trachéobronchiale et alvéolaire. Ce schéma classique va ensuite varier selon les individus, leur capacité respiratoire, d'éventuelles pathologies telles que l'asthme et la bronchite chronique. Les particules ultrafines ont la capacité de séjourner dans les poumons où elles sont soumises à des mouvements browniens et où elles peuvent diffuser. La déposition particulaire dans les poumons est sensiblement plus marquée chez des malades atteints de pathologies obstructives telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), elle est hétérogène selon les zones du poumon et la variabilité interindividuelle est très forte (Kim and Kang, 1997). Tous ces facteurs ainsi que les propriétés propres des particules et leur capacité à interférer avec les fluides broncho-pulmonaires vont jouer un rôle essentiel dans leur toxicité.

La persistance des particules va dépendre de leurs propriétés physico-chimiques et, en particulier de leur solubilité. Les molécules de cœur ou adsorbées, hydrosolubles, telles que les métaux, et certaines molécules liposolubles de faible poids moléculaire, vont rapidement être extraites et se disperser en interagissant avec les divers composés du liquide broncho-alvéolaire, en particulier les protéines et les lipides. Ceci est particulièrement vrai pour les molécules hautement réactives et pour les métaux de transition capables de produire des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et d'induire un stress oxydant. Par contre, le cœur de la particule ainsi que les molécules fortement adsorbées restent au niveau du lieu de déposition. Selon les propriétés de surface de la particule, sa composition chimique, les molécules organiques adsorbées et les protéines des fluides biologiques liées à sa surface, la particule pourra interférer avec la membrane plasmique des cellules épithéliales susceptibles alors de la phagocyter.

La clairance particulaire, c'est-à-dire les capacités des poumons à éliminer les particules inhalées, va également dépendre de ces différents facteurs. Pour les particules déposées au niveau des voies aériennes, le mécanisme de clairance est mucociliaire et l'élimination des particules rapide (en 24 h environ). Pour les particules déposées au niveau alvéolaire, la clairance macrophagique est plus lente, la demi-vie des particules pouvant atteindre des mois et, dans des conditions de surcharge chronique, conduire à l'accumulation.

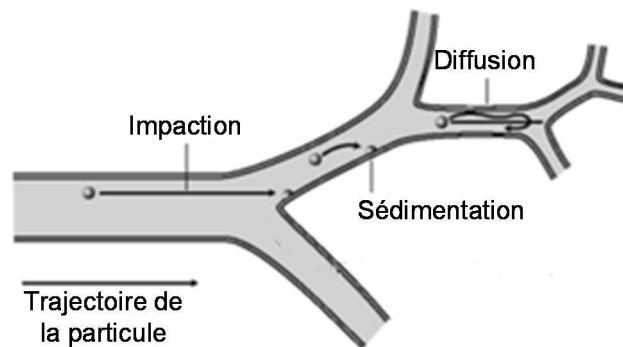


Figure 12 : Mécanismes de déposition des particules (adapté de ILO, 2013).

2.2.2. Translocation de particules à travers les barrières biologiques

Il n'existe que peu d'études de la toxicité des polluants atmosphériques à distance des poumons et notamment au niveau des cellules hématopoïétiques telles que les lymphocytes. Les particules ultrafines s'avèrent capable de traverser la barrière alvéolo-capillaire et d'être distribuées par la circulation systémique vers des organes cibles secondaires (INSERM, 1999).

La question de la translocation de particules à travers les barrières biologiques chez l'homme a été posée par des études réalisées avec des nanoparticules de carbone de 20 nm marquées au Technétium 99. L'une d'entre elles montre une translocation rapide vers le sang et une accumulation significative dans le foie (Nemmar et al., 2002), alors qu'une autre conteste ces résultats (Brown et al., 2002). Cependant, si l'on considère aussi les études réalisées chez l'animal (Elder and Oberdörster, 2006), il paraît hautement probable que les particules puissent passer la barrière épithéliale vers l'interstitium pulmonaire. Elles seraient aussi capables de franchir la paroi des vaisseaux

et de se retrouver dans le flux sanguin, distribuées ensuite au niveau de l'organisme. Leur accumulation dans certains organes cibles a été étudiée à l'aide de nanoparticules modèles (ex : billes de polystyrène marquées). Le foie est le site majeur d'accumulation, mais une accumulation mineure dans le cœur et dans le rein a également été retrouvée (Akerman et al., 2002). Par ailleurs, le passage des barrières hémato-encéphalique et placentaire est suspecté mais encore insuffisamment démontré.

Une autre voie d'entrée potentielle est la voie olfactive. Il est connu depuis de nombreuses années que certains virus peuvent emprunter le nerf olfactif, et des expériences anciennes chez le singe ont montré que des nanoparticules d'or colloïdal instillées dans les fosses nasales pouvaient être transportées vers le bulbe olfactif (de Lorenzo, 1970). La question d'un tel transfert se pose donc pour les particules atmosphériques. Des observations troublantes d'inflammation chronique du cerveau et de processus accélérés de maladies neurodégénératives chez des chiens, à Mexico, ont été associés à la forte pollution particulaire de la ville (Calderón-Garcidueñas et al., 2002).

2.3. Cancer du poumon : épidémiologie, facteurs de risque et classification

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer en France et dans le monde. Chez la femme, il est en progression constante : son incidence a triplé ces 20 dernières années. Le tabac est de loin le premier facteur de risque de cette pathologie.

Malgré les avancées thérapeutiques, son pronostic reste sombre (la survie à 5 ans n'étant que de 14 %). En effet, seul un diagnostic précoce autorise une chirurgie curative. Or, les symptômes n'apparaissent qu'à un stade avancé de la maladie. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode reconnue pour le dépistage du cancer bronchique.

La meilleure arme pour lutter contre la survenue du cancer des poumons et de la mortalité associée à cette pathologie reste la prévention, en agissant en particulier contre le tabagisme.

2.3.1. Données épidémiologiques

Avec environ 39 500 nouveaux cas estimés en 2011 en France dont 70 % survenant chez l'homme, le cancer du poumon se situe au quatrième rang des cancers, tous sexes confondus, juste après le cancer colorectal (40 500 nouveau cas). Il représente 11 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers tous sexes confondus. Chez l'homme, il se place au deuxième rang des cancers masculins avec 27 500 nouveaux cas, soit 13 % de l'ensemble des cancers incidents masculins, derrière le cancer de la prostate (71 000 cas). Chez la femme, le cancer du poumon est le troisième cancer incident avec 12 000 nouveaux cas estimés en 2011, soit près de 8 % de l'ensemble des cancers féminins, après le cancer du sein (53 000 nouveaux cas) et le cancer colorectal (19 000) (Tableau 5).

Tableau 5 : Classement des cancers par incidence et décès, tous sexes confondus, en France, 2011 (INCa, 2011).

Localisations	Incidence			Mortalité		
	Effectif ^(*)	Part (%)	Rang	Effectif	Part (%)	Rang
Prostate	71 000	19,4	1	8 700	5,9	4
Sein	53 000	14,6	2	11 500	7,8	3
Côlon-rectum	40 500	11,1	3	17 500	11,9	2
Poumon	39 500	10,8	4	29 100	19,7	1
Lèvre, cavité orale, pharynx	10 700	2,9	8	3 270	2,2	11
Lymphome malin non hodgkinien	11 700	3,2	5	3 670	2,5	8
Vessie	10 980	3,0	7	4 670	3,2	5
Rein	11 080	3,0	6	3 840	2,6	7
Pancréas	9 040	2,5	10	nd	-	-
Thyroïde	6 600	1,8	13	370	0,3	20
Mélanome de la peau	9 780	2,7	9	1 620	1,1	16
Foie	8 230	2,3	11	nd	-	-
Corps de l'utérus	6 800	1,9	12	2 080	1,4	15
Estomac	6 440	1,8	14	4 430	3,0	6
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	5 930	1,6	15	3 050	2,1	14
Système nerveux central	4 770	1,3	16	3 390	2,3	10
Ovaire	4 620	1,3	17	3 150	2,1	13
Œsophage	4 280	1,2	18	3 440	2,3	9
Leucémie aiguë	3 780	1,0	20	3 220	2,2	12
Leucémie lymphoïde chronique	3 790	1,0	19	1 060	0,7	17
Larynx	3 230	0,9	21	960	0,7	19
Col de l'utérus	2 810	0,8	22	1 000	0,7	18
Testicule	2 320	0,6	23	90	0,1	22
Maladie de Hodgkin	1 840	0,5	24	290	0,2	21
Tous cancers	365 500	100,0	-	147 500	100,0	-

* : Effectif total arrondi

Près de la moitié (48 %) des nouveaux cas de cancer du poumon se déclarent avant 65 ans (INCa, 2011). Avant l'âge de 50 ans, le taux d'incidence du cancer du poumon est assez comparable entre les deux sexes ; au-delà, les taux sont nettement plus élevés chez l'homme que chez la femme (2,5 à 4 fois plus élevés) (Tableau 6).

L'âge moyen au diagnostic n'est pas disponible pour 2011. Il était estimé en 2005, à 65 ans chez l'homme et à 64 ans chez la femme.

Tableau 6 : Nombre de cas et de décès et taux pour 100 000 personnes-années par tranche d'âge et par sexe « cancer du poumon » en 2011 (INCa, 2011).

Incidence							
	0-14	15-49	50-64	65-74	75-84	85 et +	Total
Hommes	1	1 626	11 169	8 102	5 575	1 258	27 731
Femmes	6	1 311	4 910	2 613	2 226	816	11 882
Taux spécifique pour 100 000							
Hommes	0,02	11,40	187,01	330,07	343,36	231,64	-
Femmes	0,11	9,27	77,97	95,11	93,57	64,61	-
Sex ratio H/F	0,16	1,23	2,40	3,47	3,67	3,59	-
Mortalité							
	0-14	15-49	50-64	65-74	75-84	85 et +	Total
Hommes	0	838	7 492	5 953	5 224	1 674	21 181
Femmes	0	609	2 939	1 630	1 883	1 071	8 132
Taux spécifique pour 100 000							
Hommes	0	5,88	125,44	242,52	321,74	308,24	-
Femmes	0	4,31	46,67	59,33	79,15	84,80	-
Sex ratio H/F	-	1,36	2,69	4,09	4,06	3,63	-

2.3.1.1. Évolution de l'incidence du cancer du poumon

L'hypothèse retenue pour fournir ces projections d'incidence du cancer du poumon pour l'année 2011 est celle d'une prolongation de la tendance récente où les taux d'incidence continueraient à augmenter entre 2005 et 2011. Les projections estiment les taux d'incidence (standardisés monde) en 2011 à 52,7 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et à 20,7 pour 100 000 chez la femme (Belot et al., 2008).

Les tendances évolutives de l'incidence du cancer du poumon sont différentes selon le sexe.

Chez l'homme, l'augmentation de l'incidence observée jusqu'à la fin des années 1990 s'est infléchie en 2000. Cette évolution de l'incidence s'inscrit dans le contexte de

diminution de la consommation tabagique en France, tendance également observée dans les pays développés comme au Royaume-Uni et aux États-Unis.

En revanche, chez la femme, l'augmentation de l'incidence observée lors des précédentes estimations se confirme avec un taux d'incidence passant de 3,6 en 1980 à 13,5 pour 100 000 en 2005. L'augmentation a été plus importante sur la période 2000-2005. Cette tendance évolutive, en lien avec l'évolution du tabagisme, est également observée chez la femme dans la plupart des pays occidentaux (Figure 13).

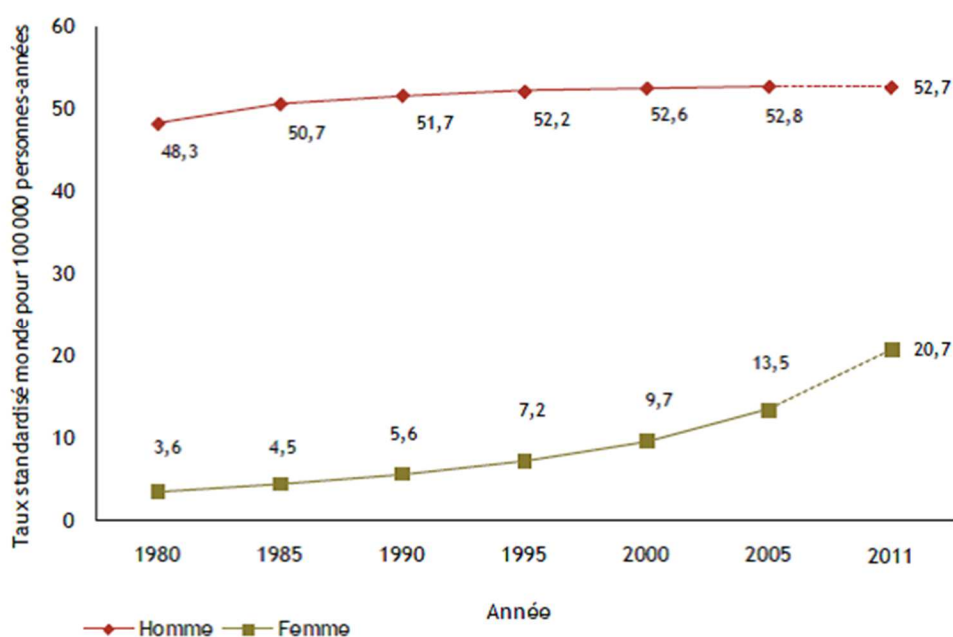


Figure 13 : Évolution de l'incidence (taux standardisé monde estimé) du cancer du poumon de 1980 à 2005 selon le sexe (Belot et al., 2008).

2.3.1.2. Incidence et mortalité estimée dans les régions

2.3.1.2.1. Incidence observée dans les régions

Chez l'homme, les taux régionaux d'incidence standardisés à la population mondiale estimés en 2005 varient entre 40,5 et 70,6 pour 100 000. La moitié des régions présente une incidence standardisée comprise entre 46 et 54. Les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans le Nord-Pas-de-Calais (+ 40 % par rapport à la moyenne française), en Lorraine (+ 26 %), en Champagne-Ardenne (+ 25 %), en Haute-Normandie (+ 21 %) et en Picardie (+ 20 %). Les trois régions présentant les taux les plus faibles sont

Midi-Pyrénées, le Limousin (- 19 % par rapport à la moyenne française) et les Pays de la Loire (- 15 %). Une diminution de l'incidence dans la majorité des régions est observée entre 2000 et 2005 (Figure 14).

Chez la femme, les taux d'incidence standardisés à la population mondiale estimés en 2005 varient entre 9,6 et 17,2 pour 100 000. La moitié des régions présente une incidence standardisée comprise entre 10,8 et 13,1. Les taux les plus élevés sont observés en Lorraine (+ 33 % par rapport à la moyenne nationale), en Île-de-France (+ 29 %) et en Corse (27 %) et les taux les plus faibles en Basse-Normandie (- 24 % par rapport à la moyenne nationale), dans les Pays de la Loire (- 23 %) et dans le Nord-Pas-de-Calais (- 22 %). Contrairement à ce qui est observé chez l'homme, l'incidence du cancer du poumon a augmenté chez la femme dans toutes les régions entre 1980 et 2005, avec une accentuation du phénomène entre 2000 et 2005 (Figure 14).

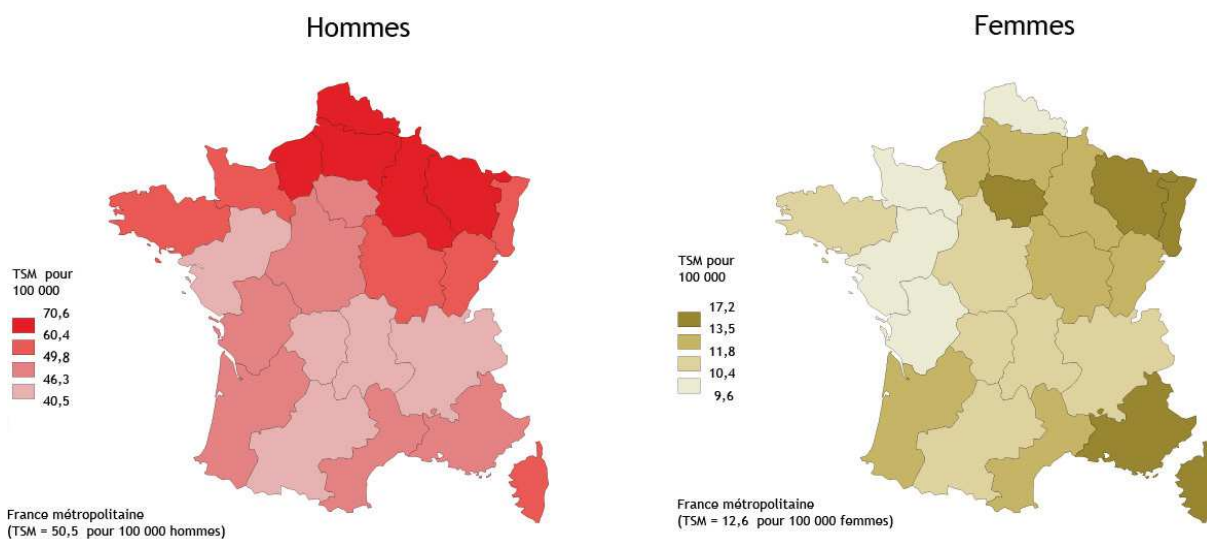


Figure 14 : Taux standardisés à la population mondiale (TSM) d'incidence des cancers du poumon à l'échelle régionale en France métropolitaine en 2005 (INCa, 2011).

2.3.1.2.2. Mortalité observée dans les régions

Chez l'homme, les taux régionaux de mortalité standardisés à la population mondiale par cancer du poumon sur la période 2004-08 varient de 36,6 pour 100 000 en Midi-Pyrénées à 57,3 pour 100 000 dans le Nord-Pas-de-Calais. Les régions du Nord-Est sont les plus touchées avec une surmortalité de 15 à 34 % par rapport à la moyenne

française : le Nord-Pas-de-Calais (+ 35 %), la Lorraine (+ 22 %), la Champagne-Ardenne (+ 20 %), la Picardie (+ 18 %) et la Haute-Normandie (+ 15 %). La région Midi-Pyrénées (- 13 %), les Pays de la Loire (- 11 %) et le Limousin (- 12 %) présentent les taux les plus faibles (environ 37 décès pour 100 000) (Figure 15).

Chez la femme, les taux régionaux (standardisés monde) varient de 7,6 pour 100 000 dans le Nord-Pas-de-Calais à 12,3 pour 100 000 en Lorraine. À l'inverse de ce qui est observé chez l'homme, les régions du Nord-Est, ne présentent pas de taux élevés, mis à part la Lorraine (+ 24 % par rapport à la moyenne nationale). Les autres régions les plus touchées sont l'Île-de-France (+ 15 %), la Corse (+ 24 %) (Figure 15)

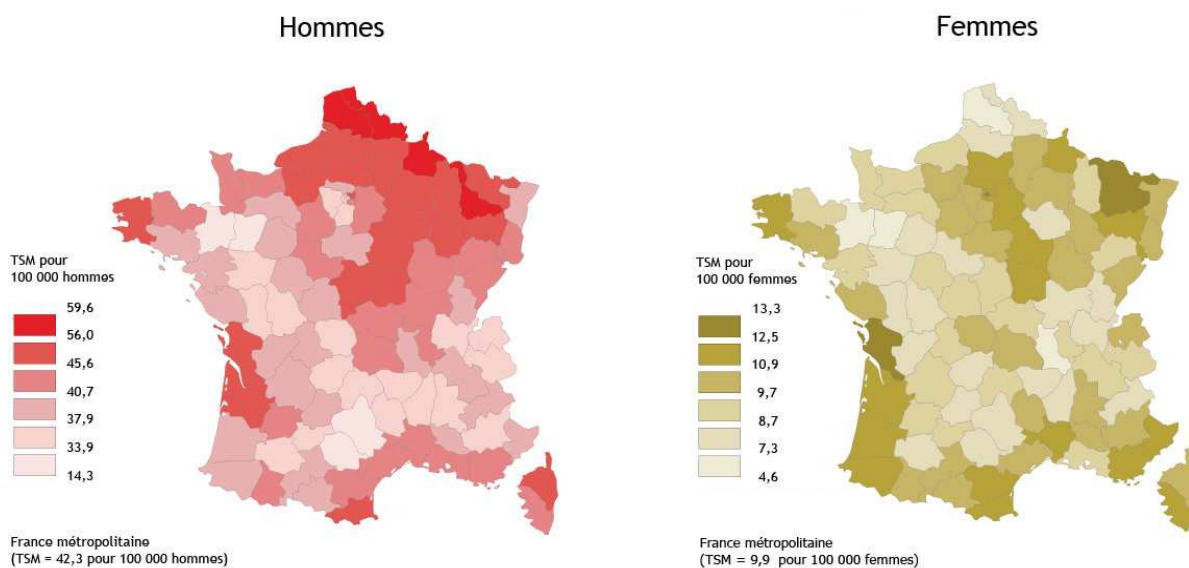


Figure 15 : Taux standardisés à la population mondiale (TSM) de mortalité par cancer du poumon à l'échelle départementale en France métropolitaine (2004-2008) (INCa, 2011).

2.3.2. Facteurs de risque de cancer du poumon

2.3.2.1. Influence de l'âge

Le cancer est la principale cause de décès entre 60 et 79 ans (Jemal et al., 2010). Plus de 50 % de tous les cancers et plus de 70 % des décès liés au cancer surviennent chez des patients âgés de 65 ans ou plus (Howlader et al., 2013). Ce problème est de plus en plus important en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation de l'espérance de vie.

Le vieillissement implique des changements complexes cellulaires (sénescence), moléculaires (mutations d'ADN) et physiologiques (diminution de la capacité à réagir face aux stress environnementaux et génétiques), favorisant la carcinogenèse et l'apparition du cancer (Anisimov, 2007).

Si l'on considère toute la population masculine confondue, le cancer du poumon est la cause principale de décès liée au cancer. Les données sont différentes pour la population âgée de plus de 85 ans. En effet, dans cette classe d'âge, la première cause de mortalité est liée au cancer de la prostate, suivie par le cancer du poumon, puis du côlon-rectum chez l'homme. Dans la population féminine de plus de 85 ans, la mortalité liée au cancer du côlon-rectum est prépondérante, suivie par le cancer du sein, puis du poumon (Yancik, 1997).

2.3.2.2. Rôle du statut tabagique

Le cancer du poumon est l'un des rares cancers pour lequel l'agent causal principal, le tabac, est depuis longtemps parfaitement identifié. En effet, les premières observations cliniques et épidémiologiques montrant l'association entre le tabagisme et le cancer du poumon datent des années 1950 (Wynder and Graham, 1950).

Pour l'année 2000, le tabac a été estimé comme étant responsable de 85 % des cas mondiaux de cancer du poumon chez l'homme et de 49 % chez la femme. En Europe, ce pourcentage atteint les 95 % chez l'homme (Collins et al., 2007; Fry et al., 1999). Le risque relatif dépend de la quantité consommée. Pour un risque de 1 chez le non-fumeur, il passe

à 15 pour un demi-paquet fumé par jour et à 64 pour deux paquets. Ce risque décroît avec un arrêt de la consommation pour se stabiliser à une valeur inférieure à 2, 20 ans après le sevrage tabagique. Concernant le tabagisme passif, le risque relatif a été évalué à 1,4 (Williams and Sandler, 2001).

2.3.2.3. Effets des polluants

Les connaissances acquises sur la toxicologie des particules atmosphériques sont en grande partie liées aux études sur les particules Diesel qui ont constitué un modèle de référence pour l'évaluation des effets biologiques en utilisant différentes approches *in vitro*, *in vivo* et chez l'homme exposé à des échappements Diesel dilués (Diaz-Sanchez et al., 1997; Salvi et al., 1999). Les particules atmosphériques sont responsables d'une réponse inflammatoire au niveau des poumons. Elles peuvent jouer un rôle d'adjuvant dans la survenue de crises d'asthme en interaction avec les allergènes, aggraver la bronchite chronique en maintenant une inflammation des voies aériennes et sont associées à l'augmentation du risque de cancer bronchique. Le Centre International de recherche sur le Cancer a reclassé les particules Diesel dans le groupe 1, cancérigène certain (Silverman et al., 2012).

D'autres facteurs environnementaux sont également liés au développement du cancer du poumon, notamment l'exposition à des substances telles que l'amiante, l'arsenic, le radon, le nickel, le cadmium, etc... (Brüske-Hohlfeld, 2009).

Concernant la pollution atmosphérique et les PM_{2.5}, ils ont récemment été reconnus comme cancérogènes certains pour l'homme (IARC group 1) (Raaschou-Nielsen et al., 2013).

2.3.3. Classification histologique des cancers du poumon

Une première classification des différents types de CBP consiste en la distinction entre Carcinome Pulmonaire Non à Petites Cellules (NSCLC, Non-Small Cell Lung Carcinoma) et Carcinome Pulmonaire à Petites Cellules (SCLC, Small Cell Lung Carcinoma) (Travis et al., 2011). Ces deux types peuvent ensuite être subdivisés en différents sous-types (Figure 16).

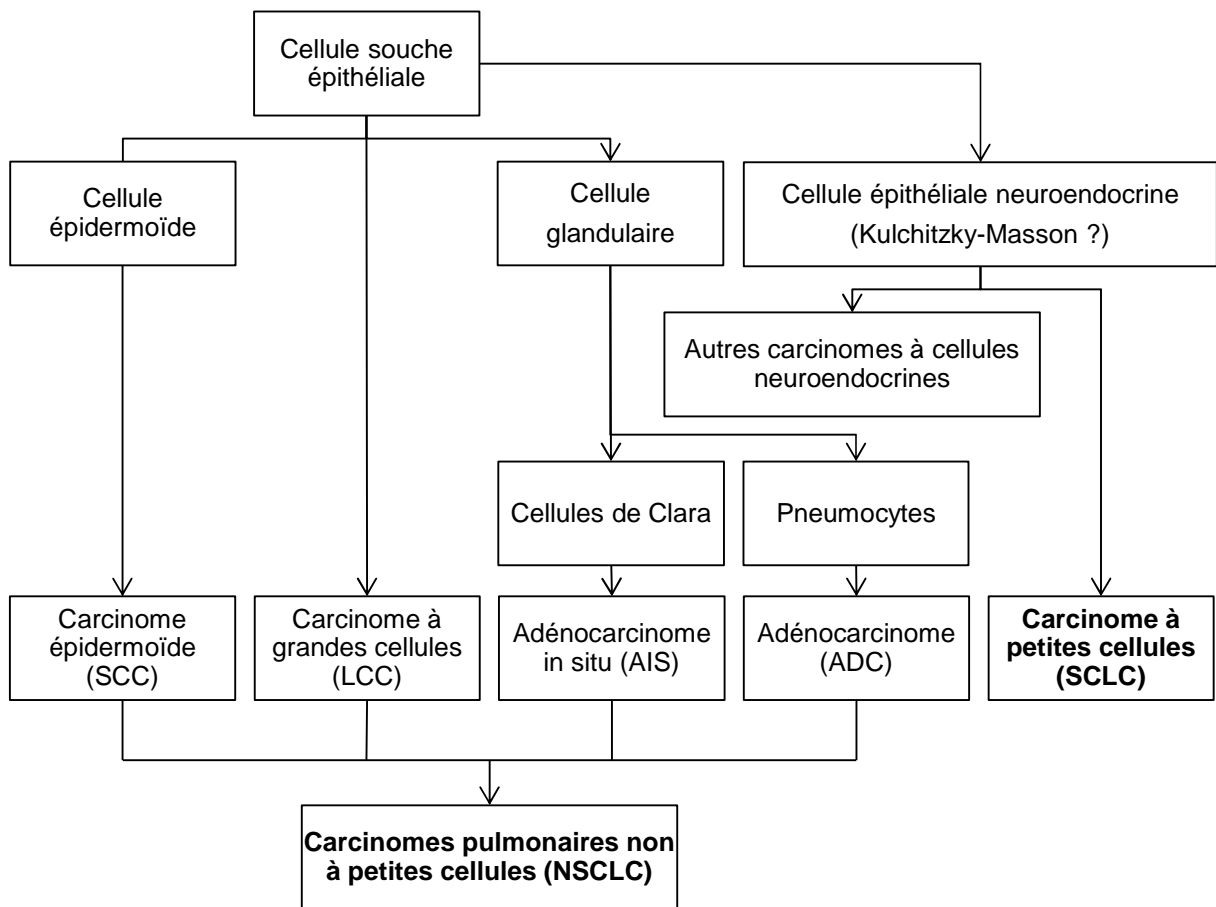


Figure 16 : Classification des cancers broncho-pulmonaires (Travis et al., 2011).

2.3.3.1. Carcinomes pulmonaires non à petites cellules

Les NSCLC représentent 80 % des CBP. Cette catégorie peut être subdivisée en plusieurs types de carcinomes, selon leur architecture, leur localisation, et les cellules dont ils sont issus.

Les **Carcinomes à Cellules Squameuses** (Squamous Cell Carcinoma, SCC) présentent une architecture épidermoïde (Figure 17A). Ils dérivent de l'épithélium bronchique pseudo-stratifié et sont majoritairement associés au tabagisme actif.

Les **adénocarcinomes** ont quant à eux une architecture glandulaire (Figure 17B). Ils peuvent être issus des pneumocytes de type I ou de type II, ou des cellules de Clara présentes dans les bronchioles périphériques, désignés alors par le terme d'adénocarcinomes bronchiolo-alvéolaires dans la classification OMS de 2004 (Travis et al., 2004). A noter cependant que le terme d'adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire a été remplacé par le terme d'**adénocarcinome in situ** dans la classification des adénocarcinomes publiée en 2011 par un comité d'expert international (Travis et al., 2011).

Les **carcinomes à grandes cellules** possèdent une architecture indifférenciée (Figure 17C). Leur origine n'est pas clairement identifiée.

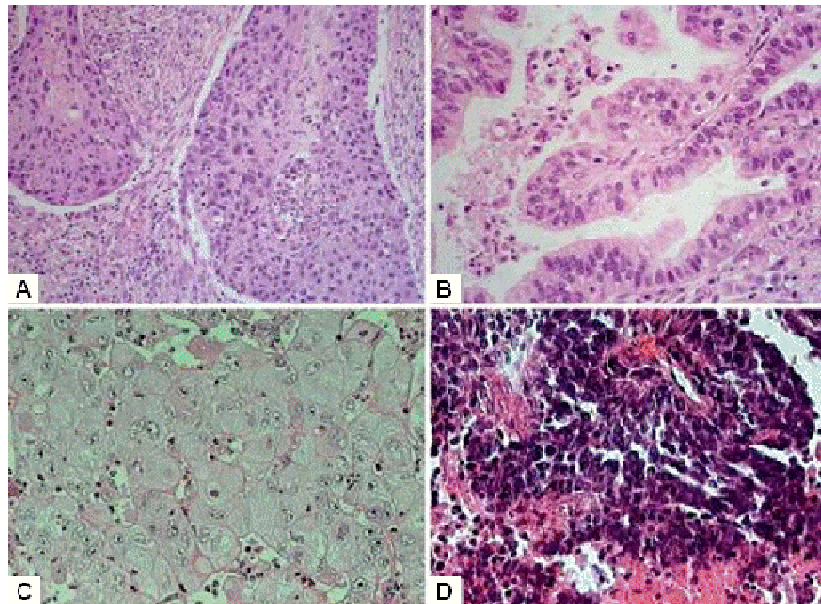


Figure 17 : Coupes histologiques de tumeurs pulmonaires de type carcinome à cellules squameuses (A), adénocarcinome (B), carcinome à grandes cellules (C) et carcinome à petites cellules (D) (Petersen, 2011).

2.3.3.2. Carcinomes pulmonaires à petites cellules

Au sens strict, le terme de SCLC ne concerne qu'un seul type de tumeur caractérisé par des cellules pauvres en cytoplasme, avec une chromatine d'apparence granuleuse, une activité mitotique élevée et de grandes plages de nécrose (Figure 17D). En pratique, le terme SCLC fait souvent référence à la famille des tumeurs de type neuro-endocrine et inclut d'autres tumeurs : les carcinomes neuro-endocrines à grandes cellules, les carcinoïdes typiques et les carcinoïdes atypiques. Leur origine reste encore discutée, mais l'hypothèse la plus communément admise est que les NSCLC dérivent de cellules précurseurs présentant des caractéristiques neuro-endocrines, appelées cellules de Kulchitzky-Masson.

2.3.3.3. Evolution histologique

L'évolution vers la cancérogenèse se traduit par des anomalies morphologiques visibles de l'épithélium respiratoire. L'épithélium normal évolue ainsi par des lésions préneoplasiques de sévérité croissante avant d'éventuellement aboutir au carcinome invasif (Brambilla, 2002).

Différentes étapes précancéreuses sont distinguées, selon l'intensité des anomalies et le niveau de l'épithélium touché (Figure 18) :

- la dysplasie légère est marquée par des anomalies discrètes (hypercellularité et pléomorphisme) ;
- la dysplasie est dite modérée lorsque les cellules anormales s'étendent sur les deux tiers inférieurs de l'épithélium, que les anomalies s'intensifient (hypercellularité, pléomorphisme moyen et anisocytose) ;
- la dysplasie sévère, les cellules anormales recouvrent tout l'épithélium et présentent de nombreuses anomalies (perte de maturation, anisocytose et pléomorphisme important). Les noyaux sont de taille irrégulière, hyperchromatiques, avec quelques mitoses ;
- la dernière étape avant le carcinome invasif est le carcinome in situ, stade auquel la taille des cellules est augmentée et le pléomorphisme très important, où les noyaux

présentent une chromatine irrégulière et ont perdu leur orientation, la membrane basale est respectée.

L'évolution du tissu normal vers le carcinome *in situ* est associée à une augmentation de l'épaisseur du tissu (Brambilla, 2002; Kerr, 2001) (Figure 18).

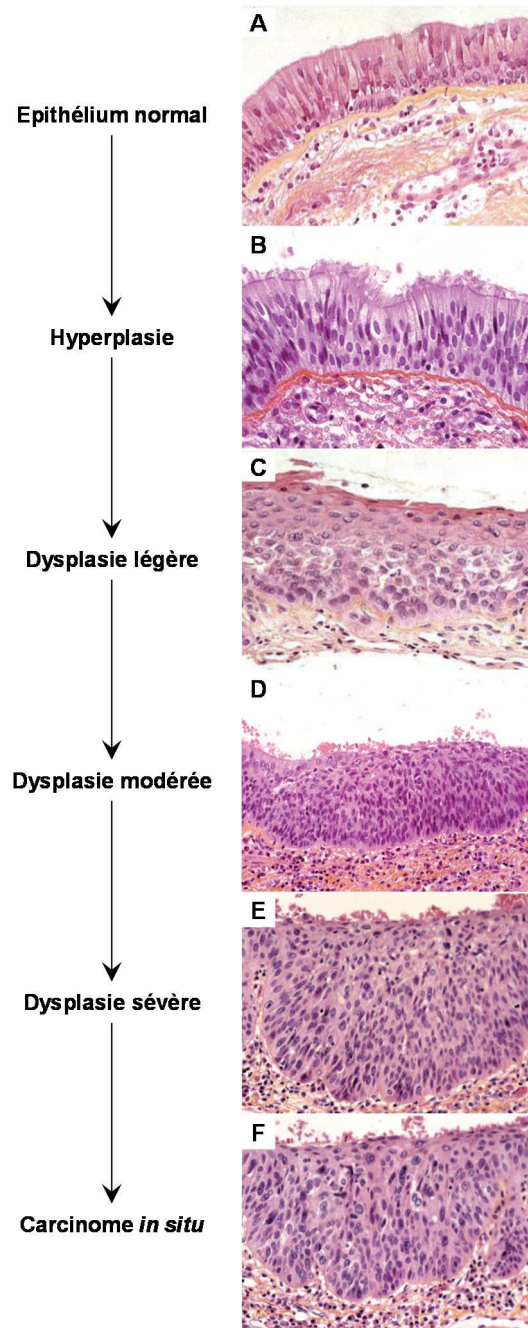


Figure 18 : Evolution histologique du tissu normal vers le carcinome *in situ*

Epithélium normal (A), Hyperplasie (B), Dysplasie légère (C), Dysplasie modérée (D), Dysplasie sévère (E), Carcinome *in situ* (F) (d'après Brambilla, 2002; Kerr, 2001).

3. Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse broncho-pulmonaire : influence de l'âge, du statut tabagique et de la pollution

La troisième et dernière partie de cette analyse bibliographique a pour but de présenter certains mécanismes connus ou supposés de toxicité des PM_{2.5}, qui pourraient influencer leur potentiel cancérogène. Nous nous pencherons donc sur les processus de stress oxydant, d'activation métabolique, de génotoxicité et d'altération épigénétique en développant l'influence de l'âge et le rôle du statut tabagique dans l'apparition de ces mécanismes cellulaires.

3.1. Cancérogénèse broncho-pulmonaire : processus multi-étapes.....	54
3.2. Stress oxydant et Inflammation.....	56
3.2.1. Généralités.....	56
3.2.2. Effets des polluants	58
3.2.3. Inflammation et cancer	60
3.3. Activation métabolique.....	62
3.3.1. Généralités.....	62
3.3.2. Effets des polluants	63
3.3.3. Activation métabolique et cancer du poumon	65
3.4. Mécanismes génotoxiques	66
3.4.1. Actions génotoxiques directes	66
3.4.2. Actions génotoxiques indirectes	68
3.4.3. Effets des polluants	68
3.4.4. Focus sur une activité génotoxique indirecte : Activité télomérase.....	69
3.5. Instabilité chromosomique, oncogènes et suppresseurs de tumeur	74
3.5.1. Instabilité chromosomique.....	74
3.5.2. Oncogènes et signaux de prolifération	75
3.5.3. Gènes suppresseurs de tumeurs et inhibiteurs de croissance.....	76
3.6. Mécanismes épigénétiques	77
3.6.1. Organisation structurale de l'ADN.....	77
3.6.2. Modifications post-traductionnelles des histones.....	79
3.6.3. Micro-ARN et expression génique.....	81
3.6.4. Méthylation de l'ADN	83
3.6.5. Interactions entre les différents mécanismes épigénétiques.....	91

3. Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse broncho-pulmonaire : influence de l'âge, du statut tabagique et de la pollution

3.1. Cancérogénèse broncho-pulmonaire : processus multi-étapes

Il est maintenant bien établi que le cancer du poumon a pour origine les cellules épithéliales bronchiques et que la transformation d'une cellule normale en carcinome invasif est un processus multi-étapes précédé par des lésions pré-malignes. Cependant, seul un petit nombre de ces lésions progressent vers un cancer invasif et la majorité d'entre elles restent latentes et même régressent. Il y a peu de données informatives concernant la séquence des altérations génétiques conduisant au cancer du poumon. Cependant, ces anomalies sont la conséquence d'une forte instabilité génétique qui se traduit par des mutations ponctuelles, des réarrangements, des délétions, des amplifications géniques ou encore des aneuploïdies.

L'analyse histologique systématique des résections chirurgicales de cancers bronchiques a permis de confirmer l'existence d'un vrai continuum lésionnel au niveau de l'épithélium de l'arbre bronchique, allant de l'hyperplasie basale au carcinome invasif en passant par des stades de métaplasie malpighienne, dysplasie légère, modérée et sévère, puis de carcinome in situ. Une corrélation entre l'existence de ce continuum lésionnel et la cancérogénèse multiétapes a été mise en évidence par l'analyse moléculaire systématique des lésions précancéreuses chez les fumeurs : l'acquisition séquentielle d'altérations génétiques s'accompagne d'une augmentation du pouvoir prolifératif et invasif de ces lésions et détermine la transition vers des lésions au potentiel évolutif important.

Ainsi, le modèle de la cancérogénèse bronchique suit le modèle général élaboré par Hanahan et ses collaborateurs selon lequel les altérations génétiques sont responsables de l'acquisition, par une cellule d'un épithélium bronchique normal, des dix propriétés élémentaires qui vont faire d'elle une cellule maligne (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 19).

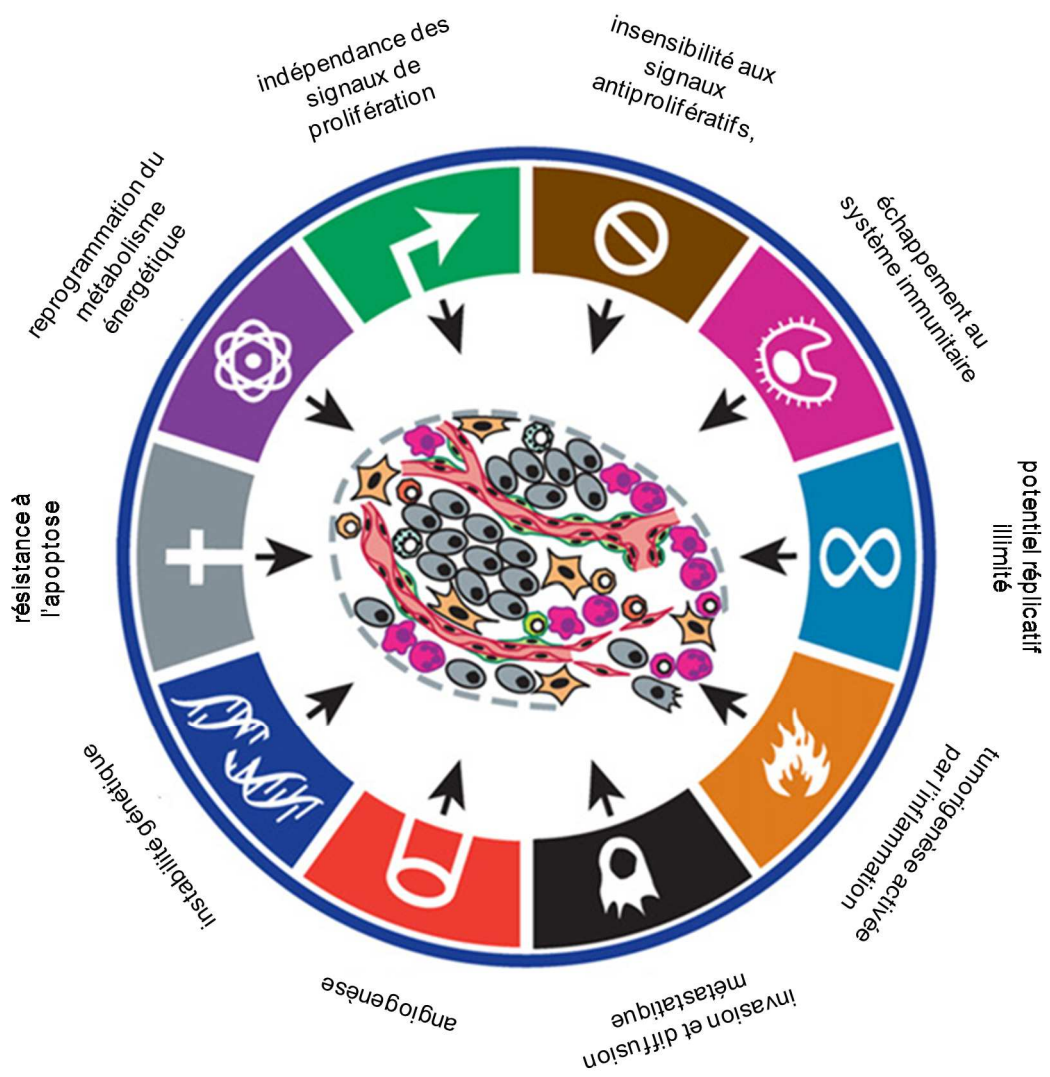


Figure 19 : Propriétés des cellules cancéreuses (d'après Hanahan and Weinberg, 2011).

3.2. Stress oxydant et Inflammation

3.2.1. Généralités

3.2.1.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les ROS sont des dérivés oxygénés réactifs. Certains sont des espèces radicalaires, tels que l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $OH\cdot$, alors que d'autres sont des espèces pro-oxydantes non radicalaires, telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Novo and Parola, 2008). Des espèces de ce type sont produites au cours du fonctionnement cellulaire normal, essentiellement par la chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas and Davies, 2000). La concentration en ROS influence la réponse cellulaire, en provoquant une activation de la voie de signalisation NRF2 à faible dose, des voies NF- κ B et AP-1 lorsqu'elles sont en concentration intermédiaire, et la mort cellulaire à forte dose (Novo and Parola, 2008) (Figure 20).

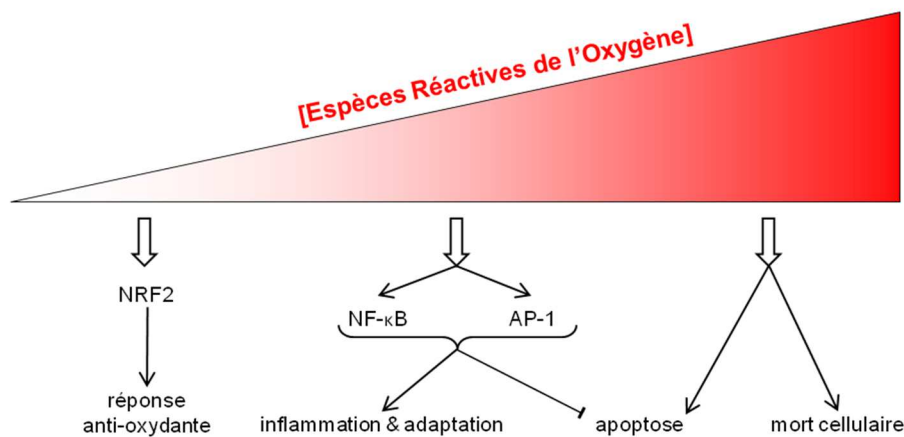


Figure 20 : Réponse cellulaire aux espèces réactives de l'oxygène (adapté de Novo and Parola, 2008).

L'oxygène représente ainsi un paradoxe pour les organismes aérobies : il est indispensable à leur survie tout en étant à l'origine d'espèces réactives toxiques, dont certaines interviennent dans la signalisation intracellulaire (Valko et al., 2007). La production et l'élimination des ROS et d'autres intermédiaires réactifs est donc un processus hautement contrôlé, régulé par différents systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Figure 21). Parmi les défenses enzymatiques figurent la SuperOxyde Dismutase (SOD), la catalase et la Glutathion Peroxydase (GPx), alors que les défenses

non enzymatiques sont assurées essentiellement par l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) ainsi que par les vitamines.

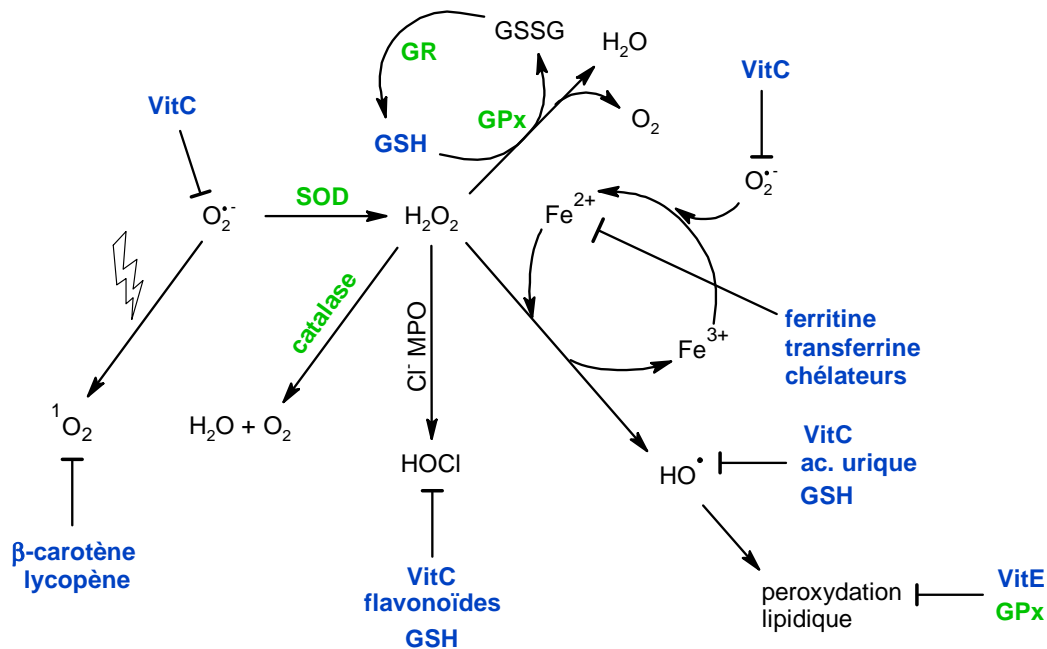


Figure 21 : Production d'espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydant enzymatiques et non enzymatiques (adapté de Valko et al., 2007).

GPx : Glutathion Peroxydase ; GR : Glutathion Réductase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; MPO : MyéloPerOxydase ; SOD : SuperOxyde Dismutase ; Vit : Vitamine.

3.2.1.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant

Dans certaines conditions pathologiques (surproduction de ROS, apport massif de ROS exogènes, dysfonctionnement des systèmes de défense), il peut arriver que la production d'espèces oxydantes soit supérieure aux capacités de défense de la cellule, conduisant à un état de déséquilibre appelé stress oxydant. Les ROS non pris en charge par les systèmes antioxydants sont alors capables d'interagir avec différentes macromolécules intracellulaires, conduisant à des lésions de l'ADN, à un phénomène de peroxydation lipidique, ou encore à une oxydation des protéines (Siems et al., 1995; Stadtman, 2004; Valko et al., 2006) (Figure 22).

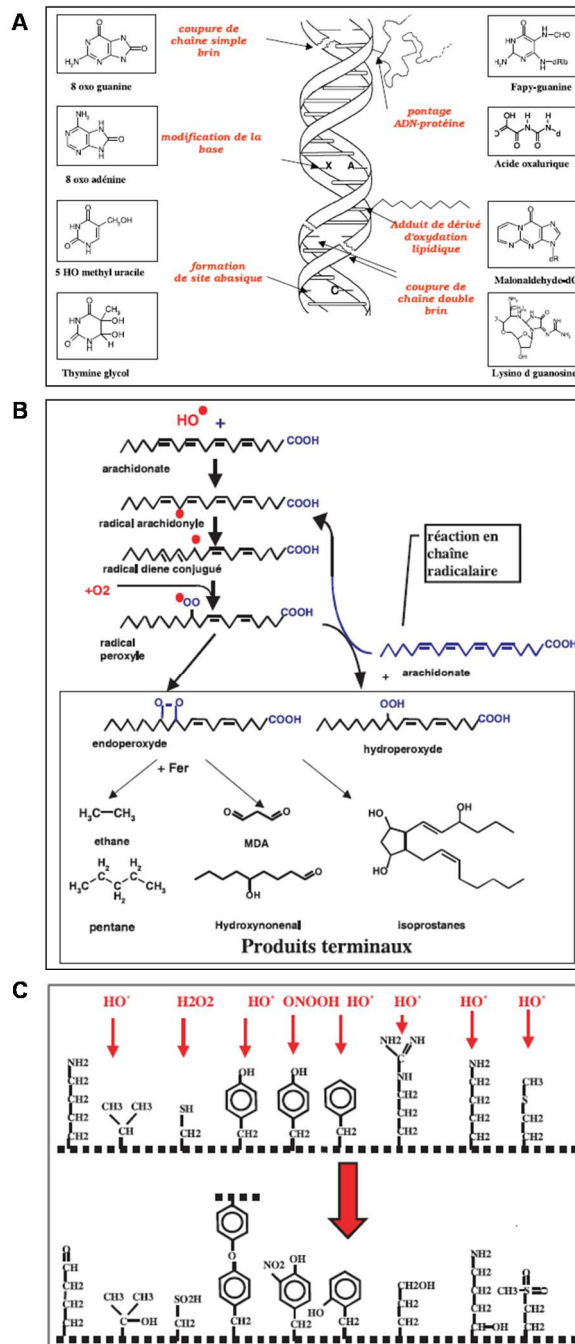


Figure 22 : Conséquence des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN (A), les lipides (B) et les protéines (C) (Favier, 2003).

3.2.2. Effets des polluants

Il a été montré que l'exposition de cellules pulmonaires à des PM_{2.5} conduisait à la production de ROS (Deng et al., 2013; Dergham et al., 2012; Vattanasit et al., 2014). Le stress oxydant induit jouerait un rôle important dans la toxicité des particules (Knaapen et al., 2004; Valavanidis et al., 2008). Différents mécanismes de formation de ces ROS ont

été évoqués, faisant intervenir la surface de la particule, les métaux de transition, les composés organiques, une altération des fonctions mitochondriales, ou encore l'activation de cellules inflammatoires capables de produire des ROS (Risom et al., 2005).

Nous nous intéresserons ici à l'incidence des caractéristiques intrinsèques des PM_{2.5} sur la formation de ROS, à savoir la surface des particules, ainsi que leur contenu en métaux et en composés organiques.

3.2.2.1. Surface de la particule

L'importance de la surface des particules a été montrée en comparant des particules de composition similaire mais de taille variable. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une toxicité accrue de particules nanométriques de CuO (Karlsson et al., 2009), de granit (Ahmad et al., 2012) ou encore de nickel (Zhang et al., 2003). Bien que cette différence de toxicité semble, de prime abord, liée à la masse, Oberdörster et al. ont montré que l'inflammation pulmonaire après instillation intra-trachéale de particules de TiO₂ de taille nano- ou micro métrique était mieux représentée par la surface des particules que par leur masse (Oberdörster et al., 2000) (Figure 23). Ainsi, les particules ultrafines auraient une réactivité de surface accrue en interaction avec les cellules, conduisant à une production plus importante de ROS à l'origine de leur toxicité (Donaldson et al., 1996).

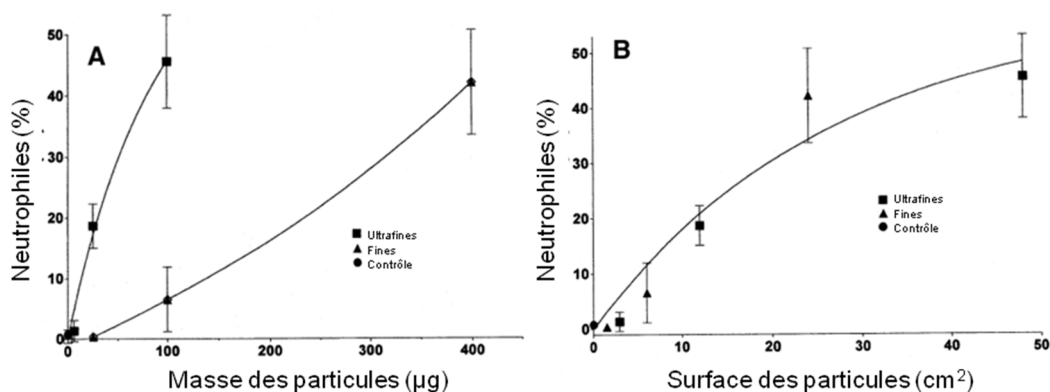


Figure 23 : Réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat, en fonction de la masse (A) et de la surface spécifique (B) des particules (d'après Oberdörster et al., 2000).

3.2.2.2. Métaux

Certains métaux de transition composant les particules, tels que le fer, le cuivre, le chrome ou le vanadium, sont capables de produire des radicaux hydroxyles hautement réactifs en catalysant la réaction de Fenton (Novo and Parola, 2008) (Figure 24).

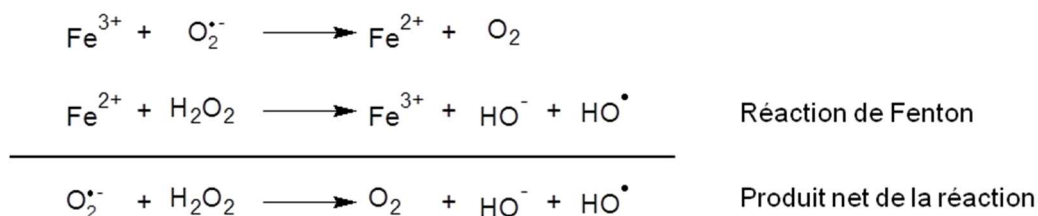


Figure 24 : Production de ROS par la réaction de Fenton dépendante du fer (d'après Kehrer, 2000).

Il a également été montré que le cadmium, bien que n'étant pas capable de catalyser la réaction de Fenton (Waisberg et al., 2003), était capable d'induire un stress oxydant *in vitro* et *in vivo* (Joseph et al., 2001; Shih et al., 2004) en diminuant les concentrations intracellulaires en glutathion ou en réduisant les activités SOD, catalase, ou GPx (del Carmen et al., 2002; El-Maraghy et al., 2001).

3.2.2.3. Fraction organique

Des ROS peuvent être produites par les Cytochromes P450 (CYP), enzymes impliquées dans la métabolisation des composés organiques. L'activité du CYP1A1 est ainsi associée à la production d'H₂O₂ au niveau intracellulaire (Barouki and Morel, 2001).

De plus, les quinones contenues dans la fraction organique ou issues de la métabolisation d'autres composés tels que les HAP ou les COV, sont capables de générer des ROS via un phénomène de « cycle redox » (Dellinger et al., 2001).

3.2.3. Inflammation et cancer

La relation inflammation-cancer est un paradigme généralement accepté (Aggarwal et al., 2006; Balkwill et al., 2005; Coussens and Werb, 2002). Cette observation a été signalée pour la première fois en 1863 par Rudolf Virchow, qui nota la présence de

leucocytes dans le tissu néoplasique et supposa qu'il existait un lien entre l'inflammation et le cancer. L'inflammation initiale implique le recrutement de nombreuses cellules inflammatoires vers des sites endommagés avec une libération de cytokines et d'autres agents pro-inflammatoires. Des aberrations des mécanismes apoptotiques et de phagocytose de cellules inflammatoires peuvent mener à une inflammation persistante, chronique. Dans ce contexte, la prolifération cellulaire persistante et la production importante de facteurs de croissance, de cytokines, de dérivés réactifs de l'oxygène pouvant causer des dommages à l'ADN, contribuent à la création d'un microenvironnement pro-tumoral (Lu et al., 2006). On y retrouve des macrophages mais également d'autres types cellulaires tels que des neutrophiles, des éosinophiles, des cellules dendritiques, des mastocytes et des lymphocytes.

Le développement du cancer est régulé par la présence de messagers de l'inflammation tels que des cytokines (Tumor Necrosis Factor ou TNF- α , Interleukine-1 ou IL-1) ou des chimiokines mais aussi par le remodelage tissulaire et l'angiogenèse associés à l'inflammation.

Le risque de cancer du poumon est associé à la sévérité et à la durée de la maladie inflammatoire (Borm and Driscoll, 1996). Une relation entre la maladie asthmatique et les cancers pulmonaires a depuis longtemps été établie (Vesterinen et al., 1993).

Les particules atmosphériques sont responsables d'une réponse inflammatoire au niveau des poumons. Elles peuvent jouer un rôle d'adjuvant dans la survenue de crises d'asthme en interaction avec les allergènes. Elles peuvent aggraver la bronchite chronique en maintenant une inflammation des voies aériennes (Brook et al., 2010).

3.3. Activation métabolique

3.3.1. Généralités

Selon certaines estimations, 75 % des molécules cancérigènes seraient issues de l'activation de pro-cancérigènes par les systèmes enzymatiques intracellulaires (Nebert and Dalton, 2006). Ce phénomène, appelé activation métabolique, se produit au cours de la biotransformation de ces composés, lorsque des métabolites plus réactifs que la molécule initiale sont générés.

La biotransformation des xénobiotiques a pour conséquence d'augmenter leur hydrophilie afin de permettre leur élimination. De manière générale, elle est réalisée par les Enzymes de Métabolisation des Xénobiotiques (EMX), classées comme appartenant aux phases I ou II (Figure 25). Cette répartition est essentiellement fonctionnelle et certaines enzymes de phase II peuvent ainsi agir avant d'autres enzymes de phase I, voire être les seules à transformer un xénobiotique en l'un de ses métabolites ultimes. Plusieurs enzymes de phase I peuvent également agir successivement, avant une éventuelle prise en charge des métabolites par les enzymes de phase II.

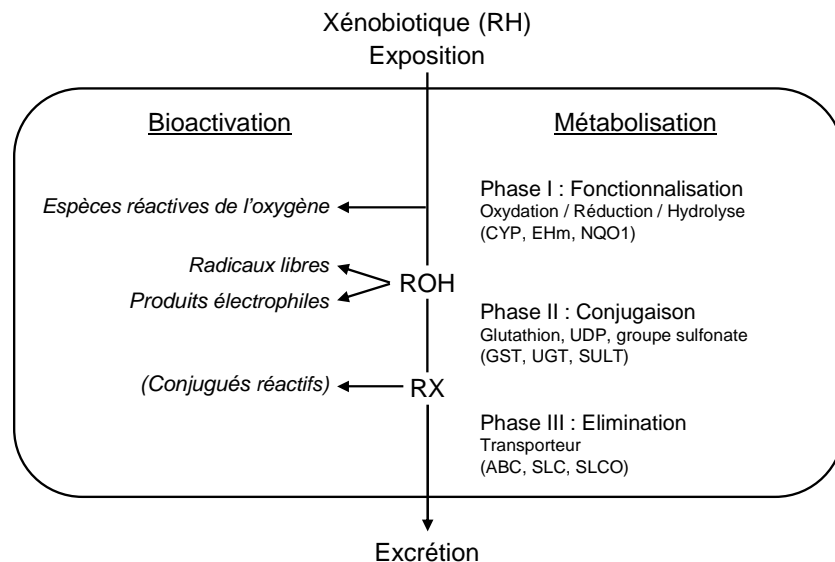


Figure 25 : Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques (d'après (Castell et al., 2005; Ding and Kaminsky, 2003; Xu et al., 2005).

CYP : Cytochrome P450 ; *EHm* : Epoxyde Hydrolase microsomale ; *NQO1* : NADPH-Quinone Oxydoréductase 1 ; *GST* : Glutathion-S-Transférase ; *UGT* : UDP-GlucuronosylTransférase ; *SULT* : SulfoTransférase ; *ABC* : ATP-Binding Cassette ; *SLC* : SoLute Carrier ; *SLCO* : SoLute Carrier Organic anion.

La première phase de métabolisation permet la fonctionnalisation de la molécule, par l'ajout ou le démasquage d'un groupement fonctionnel facilitant, suite à une réaction d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. L'oxydation des xénobiotiques est majoritairement réalisée par les CYP, une famille d'enzymes regroupant 57 gènes actifs chez l'Homme (Gotoh, 2012). La fonctionnalisation du xénobiotique peut également être assurée par les Flavine Mono-Oxygénases, les Alcool DésHydrogénases (ADH), une Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH), AldoKétoRéductases (AKR), Epoxyde Hydrolases microsomaux (EHm), ou encore la NADPH-Quinone Oxydo-réductase 1 (NQO1).

La seconde phase de métabolisation correspond à la conjugaison du xénobiotique, fonctionnalisé ou non, avec un groupement polaire, tel que le GSH par les Glutathion-S-Transférases (GST), l'acide glucuronique par les UDP-Glucuronosyl-Transférases (UGT), ou encore un groupement sulfate par les SULfo-Transférases (SULT). La conjugaison du xénobiotique rend ce dernier encore plus hydrosoluble, facilitant ainsi son élimination.

Une troisième phase, impliquant des transporteurs, permet la sortie des xénobiotiques conjugués hors de la cellule. En effet, les xénobiotiques devenus hydrosolubles sont incapables de franchir les membranes plasmiques par diffusion. Ils sont alors pris en charge par des transporteurs dits de phase III, tels que ceux des familles ATP-Binding Cassette (ABC), SLC (SoLute Carrier), ou SLCO (SoLute Carrier Organic anion), leur permettant d'être excrétés des cellules pour être ensuite éliminés, par la voie urinaire, biliaire, ou via les fèces (Castell et al., 2005).

3.3.2. Effets des polluants

Comme nous l'avons vu précédemment, différents composés organiques peuvent entrer dans la composition des PM_{2.5}, tels que des HAP, COV, dioxines (PCDD-F) ou encore polychlorobiphényles (PCB). Parmi eux, les PCDD/F sont résistants à la biodégradation et s'accumulent dans le foie et les tissus adipeux. A l'inverse, d'autres molécules peuvent être transformées et bioactivées dans l'organisme. Un excès de métabolites réactifs peut être généré, car les enzymes de phase II sont généralement moins inductibles que celles

de phase I. Ce phénomène a été décrit pour différents types de composés, dont des HAP, des COV ou encore des PCB. Les composés réactifs formés (e.g. quinones, époxydes, aldéhydes) exercent le plus souvent leur toxicité via l'apparition d'un stress oxydant, la formation d'adduits à l'ADN, ou encore la modification d'autres macromolécules cellulaires, telles que des protéines ou des lipides.

3.3.2.1. HAP

Le B[a]P est souvent pris comme modèle pour l'étude de l'activation métabolique des composés organiques. En effet, la transformation de ce HAP par les EMX peut induire la formation de métabolites réactifs de différents types et via différentes voies. Plusieurs enzymes peuvent ainsi être impliquées dans l'activation métabolique du B[a]P, à savoir les CYP 1A1, 1B1 et 2S1, ainsi que la SULT1B1. Les GST, certaines SULT et des UGT vont permettre la détoxification des métabolites précédemment générés (Bui et al., 2009; Castell et al., 2005; Shimada, 2006; Teubner et al., 2002). La NQO1 empêche le phénomène de « cycle redox » des quinones, en les transformant en hydroquinones (Joseph et al., 1998).

3.3.2.2. COV

La métabolisation des COV, dont le composé type est le benzène, peut également donner lieu à la production de métabolites réactifs. Les CYP 2E1 et 2F1 ainsi qu'une ADH sont impliqués dans les étapes préalables de transformation du benzène, conduisant *in fine* à la formation d'aldéhyde, d'hydroquinone ou de quinones toxiques. A l'inverse, différentes SULT, GST et UGT, ainsi que la NQO1, interviennent dans la détoxification de ces métabolites (Bauer et al., 2003; Latriano et al., 1986; Snyder and Hedli, 1996; Yasuda et al., 2007).

3.3.2.3. PCB

L'activation métabolique des PCB, faiblement documentée, passe par une étape d'hydroxylation, réalisée par différents CYP des familles 1A et 2B (Kaminsky et al., 1981), dont le CYP2B6 (Warner et al., 2009). Le taux d'hydroxylation des PCB est inversement proportionnel au nombre de substitutions par le chlore (Song et al., 2013b). Une étude

chez le rat a montré que certains congénères d'hydroxy-PCB peuvent ensuite être conjugués à l'acide glucuronique par une UGT (e.g. 1A1, 1A6, 1A7) afin d'être éliminés (Daidoji et al., 2005). Toutefois, leur métabolisation peut aboutir à la formation de quinones toxiques, capables de former des adduits à l'ADN (Pereg et al., 2002).

3.3.3. Activation métabolique et cancer du poumon

La plupart des cancérogènes chimiques contenus dans la fumée du tabac nécessitent une activation métabolique pour exercer leurs effets (Hecht, 1999). Les enzymes requises sont présentes dans les poumons et autres organes « cibles ». Le risque individuel peut être affecté par l'activité et les niveaux d'enzymes telles que la glutathion-S-transférase, le cytochrome P450 et les N-acétyl-transférases. Lors du processus métabolique, les formes réactives des hydrocarbures aromatiques polycycliques, nitrosamines et amines aromatiques sont générées et se lient par covalence sur l'ADN dans les différents tissus.

A côté du rôle bien établi de la consommation de tabac et de l'exposition environnementale, il existe des facteurs génétiques qui contribuent aussi au développement des cancers du poumon. Il y a en effet des gènes de prédisposition à la transformation maligne incluant des gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes comme CYP1A1 (Cytochrome p450 1A1) et / ou dans leur détoxification comme GSTM1 (Glutathione-S-Transferase M1) (Shields, 2002). Les modifications de ces gènes peuvent être héritées et / ou acquises et ainsi contribuer au risque de développer un cancer.

3.4. Mécanismes génotoxiques

La définition de la génotoxicité selon le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC,1993) inclut à la fois des effets directs et indirects sur l'ADN. La génotoxicité précède ainsi la mutagenicité mais la plupart des lésions génotoxiques sont réparées et ne sont jamais exprimées sous la forme de mutations (Figure 26).

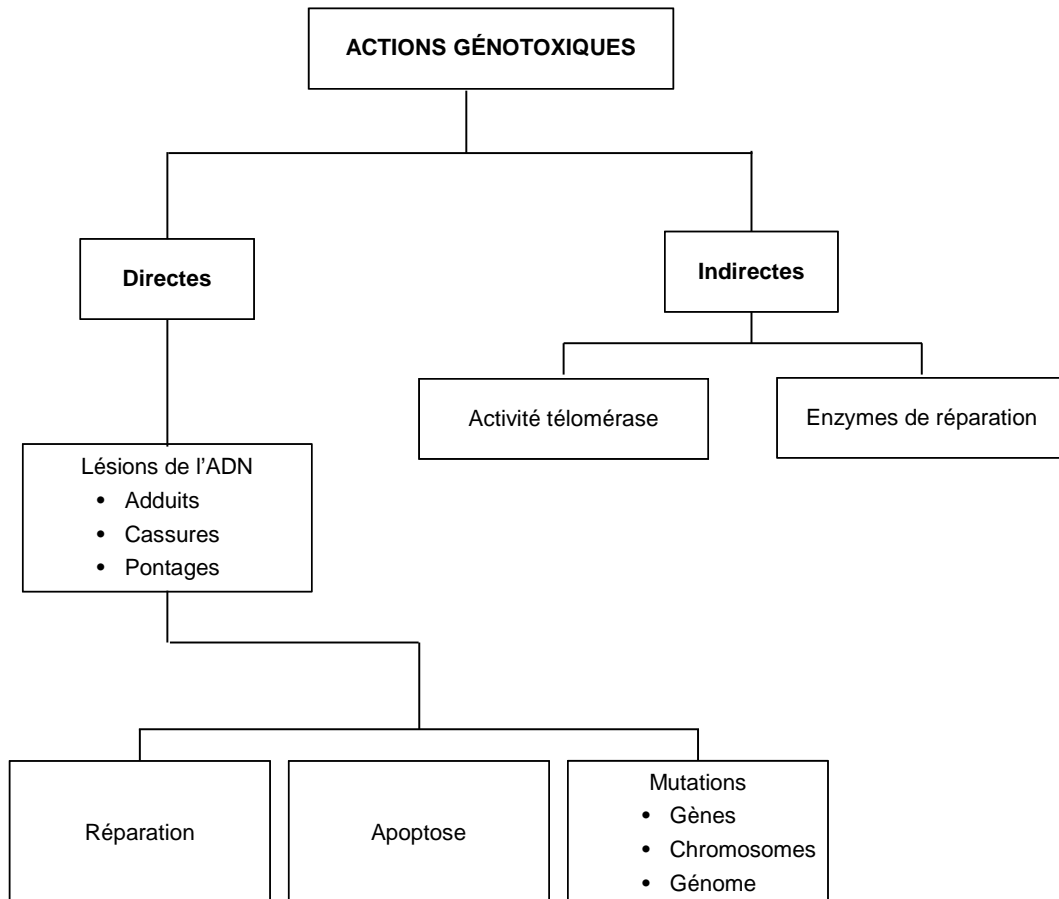


Figure 26 : Actions génotoxiques directes et indirectes.

3.4.1. Actions génotoxiques directes

L'ADN, découvert en 1871 par le biologiste suisse Friedrich Miescher, a pour principales fonctions de stocker et transmettre l'information génétique (Avery et al., 1944).

L'ADN est une macromolécule biologique à laquelle sont attribuées des structures primaire, secondaire et tertiaire. Il apparaît que la séquence en nucléotides (structure

primaire), la configuration et la situation des nucléotides au sein de la double hélice (structure secondaire) et l'état sous lequel se trouve la molécule d'ADN (en cours de réplication ou de transcription, sous forme de chromatine ou de chromosome : structure tertiaire) jouent un rôle considérable dans la survenue des lésions puis des mutations éventuelles. En effet, l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques et la mise en œuvre des systèmes de réparation de l'ADN varie considérablement d'une situation à l'autre.

L'ADN est soumis à de multiples attaques inévitables, de la part du milieu intracellulaire et de l'environnement provoquant la formation de plusieurs milliers de lésions par jour et par cellule (bases modifiées, sites abasiques, cassures simple ou double brins, pontage ADN-protéines...). L'exposition à des agents chimiques ou physiques est susceptible d'initier toute une cascade d'événements toxiques (Shugart et al., 1992) à commencer par les lésions primaires de l'ADN. L'ADN est chimiquement modifié : on observe soit des ruptures de liaisons covalentes qui, lorsqu'elles se situent sur le désoxyribose peuvent conduire à des cassures de brins, soit l'établissement de liaisons covalentes conduisant à des adduits, à des alkylations de bases, à des pontages ADN-ADN intra- ou inter-brin par exemple.

La survie de la cellule est assurée dans la majorité des cas par l'action des mécanismes de réparation de l'ADN qui éliminent les lésions avant qu'elles ne soient engagées dans des processus comme la réplication ou la transcription. Ils assurent le maintien de la molécule d'ADN et en conséquence la stabilité de l'information génétique. Lorsque la réparation est absente ou incomplète, et selon la nature des lésions, la cellule va mourir ou bien muter.

On distingue les mutations concernant une à quelques paires de bases, qualifiées de mutations géniques, et les mutations chromosomiques ou génomiques concernant le plus souvent des dizaines de kilobases, voire des bras de chromosomes entiers.

Comme décrit précédemment, des mutations dans la séquence des gènes qui gouvernent le cycle cellulaire peuvent conférer aux cellules la propriété de proliférer de manière incontrôlée et finalement aboutir au cancer.

3.4.2. Actions génotoxiques indirectes

Les agents génotoxiques peuvent exercer leur action délétère par interaction directe avec l'ADN, mais également de manière indirecte (Mateuca et al., 2006). Les agents génotoxiques indirects induisent principalement des mutations chromosomiques de nombre en agissant, non pas avec l'ADN, mais avec les structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromatides au cours de la division cellulaire.

Les agents génotoxiques indirects peuvent également exercer leur action délétère en se liant à des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome telles que les tubulines, les enzymes de réparation de l'ADN, les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire.

3.4.3. Effets des polluants

Les agents génotoxiques peuvent donc atteindre tous les composants cellulaires : les centromères, les éléments participant au contrôle du cycle cellulaire (cyclines, kinase dépendantes des cyclines, *TP53*), les molécules de l'appareil mitotique (tubuline, centrioles, protéines motrices des microtubules ou MAPs) ou encore les structures indirectement impliquées dans le cycle cellulaire (telles que les membranes cellulaires ou nucléaires) (Kirsch-Volders et al., 2003). Les dommages créés par les agents génotoxiques sur la membrane plasmique peuvent entraîner une mort cellulaire par nécrose, en raison de la perte des fonctions de barrière et d'échange assurées par cette membrane.

Des produits chimiques tels que le nocodazole induisent une mauvaise ségrégation des chromatides en interférant avec le fonctionnement du fuseau mitotique.

Les métaux, quant à eux, forment une classe particulièrement complexe de mutagènes car ils ont de multiples cibles cellulaires. En effet, ils interagissent de différentes manières avec la machinerie cellulaire : par compétition avec les autres métaux, par liaison à l'ADN, à des acides aminés spécifiques (par exemple histidine) ou à des sites spécifiques (groupement thiol). Les effets génotoxiques d'un métal donné sont de ce fait fonction de son affinité relative pour ces différents sites de liaisons. Le profil génotoxique spécifique de chaque métal sera donc un mélange de lésions par interaction directe de l'ADN ou indirecte avec les molécules de l'appareil mitotique ou les systèmes de réparation de l'ADN et d'induction d'apoptose (Mateuca et al., 2006).

La nicotine contenue dans la fumée de cigarette peut également moduler l'expression de certains gènes (Lee and D'Alonzo, 1993). La nicotine se lie et active les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (neurotransmetteur du système nerveux central et périphérique) et augmente ainsi le calcium intracellulaire et conduit à l'activation d'un facteur de transcription essentiel pour de nombreux gènes (Shen and Yakel, 2009).

3.4.4. Focus sur une activité génotoxique indirecte : Activité télomérase

3.4.4.1. Généralités

Les télomères assurent la stabilité des extrémités chromosomiques. Ces extrémités composées des répétitions de la séquence TTAGGG n'adoptent pas une structure chromatinienne classique mais forment des complexes nucléoprotéiques spécifiques impliquant des protéines affines de l'ADN télomérique. Ces complexes peuvent entraîner la formation d'une boucle ou lasso, appelée boucle-T, qui pourrait contribuer à la stabilité des extrémités naturelles des chromosomes. La principale cause de réarrangement télomérique est la division cellulaire elle-même, qui s'accompagne physiologiquement de la perte de motifs TTAGGG, lors du fonctionnement normal de la machinerie de réplication. Ainsi, lorsqu'ils atteignent une taille critique, la cellule entre en sénescence et arrête de proliférer, à moins qu'elle ne mette en œuvre une stratégie afin d'éviter l'attrition télomérique par l'expression d'une enzyme, la télomérase (Figure 27).

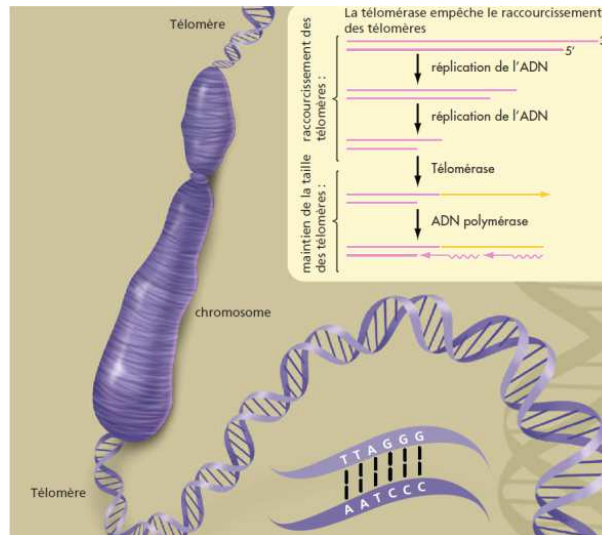


Figure 27 : Structure du télomère et de la télomérase (adapté de Armanios and Blackburn, 2012).

Les cellules somatiques présentent une activité télomérase quasiment nulle et ne possèdent donc pas de mécanisme de maintien de la longueur des télomères. En revanche, les cellules cancéreuses évitent l'érosion télomérique en activant la télomérase (85 à 90 % des tumeurs). L'expression de la télomérase permet en effet d'immortaliser les cellules somatiques normalement vouées à un nombre restreint de divisions cellulaires (Bodnar et al., 1998; Vaziri and Benchimol, 1998). Ceci suggère un lien entre télomérase et cancer, et soulève la question de la dualité de cette enzyme vis-à-vis du processus de tumorigénèse.

3.4.4.2. **Activité télomérase : processus pro et anti-tumoral**

Lorsque les cellules somatiques, présentant une activité télomérase nulle ou très faible, réalisent un grand nombre de divisions cellulaires, on observe un raccourcissement des télomères, jusqu'à l'entrée en phase de sénescence, qui s'accompagne d'un arrêt net de la prolifération. A ce stade, il existe un point de contrôle impliquant *TP53* et la protéine Rb qui empêche les cellules de repartir en prolifération. Ainsi, la sénescence peut apparaître comme un mécanisme anti-tumoral qui bloque la prolifération des cellules ayant réalisé un trop grand nombre de divisions. En revanche, si malgré tout, une anomalie cellulaire permet à la cellule de passer ce point de contrôle et de continuer à proliférer, le raccourcissement des télomères s'accroît et la cellule entre en phase de crise qui s'accompagne d'une très forte instabilité génétique. Lors de cette phase, un

grand nombre de cellules entrent en apoptose, mais une partie d'entre elles acquièrent des mutations permettant l'expression d'oncogènes, et le rétablissement d'un mécanisme de maintien de la longueur des télomères avec une surexpression de la télomérase, ce qui peut aboutir à la naissance d'un clone cancéreux. Dans ce cas, la télomérase peut apparaître comme une protéine pro-carcinogène. Son rôle dans l'induction de la prolifération et la protection contre l'apoptose peut aussi participer à ce rôle carcinogène. Cependant, on sait que si les cellules expriment la télomérase avant le raccourcissement télomérique, celle-ci permet de protéger les extrémités des chromosomes et donc d'éviter l'apparition d'instabilité génétique. En effet, il a été montré que les modèles de souris invalidées pour la télomérase (souris mTERC^{-/-}), présentaient un plus grand nombre de tumeurs spontanées dues à l'instabilité génétique provoquée par l'absence de télomérase fonctionnelle (Rudolph et al., 1999). Ceci porterait à croire que la télomérase n'est pas indispensable au processus de tumorigénèse et que le maintien des télomères peut être réalisé par d'autres mécanismes tels que l'Alternative Lengthening of Telomere (ALT).

3.4.4.3. Influence de l'âge

De nombreuses études ont démontré que la longueur des télomères présents dans les lymphocytes humains se raccourcit progressivement en fonction de l'âge des individus analysés (Weng et al., 1998). Les télomères les plus courts sont retrouvés chez les octogénaires (4000 à 6000 pb), tandis que, chez les nouveau-nés, la longueur des télomères oscille entre 8000 à 12000 pb.

Lors de la première année de vie, il y a une perte accélérée des télomères dans les cellules du sang périphérique telles que les granulocytes et les lymphocytes T naïfs (Rufer et al., 1999). Une des interprétations de ces résultats serait que les cellules-précurseurs, c'est-à-dire les cellules souches hématopoïétiques qui produisent directement les granulocytes et les lymphocytes T naïfs, ont un nombre de divisions cellulaires accru au cours de la première année de la vie. Par la suite et durant plus de 80 ans, la perte des télomères devient plus graduelle, mais reste néanmoins élevée. Un déclin rapide des télomères a également été observé dans les lymphocytes T mémoires durant les quatre

premières années de vie. Cette perte reflèterait la réplication active des lymphocytes mémoires lors de réponses immunes après infection et/ou vaccination. De plus, les lymphocytes mémoires s'accumulent au cours de la vie et reflètent l'histoire des infections répétitives dues aux pathogènes que nous hébergeons.

Les lymphocytes seraient dotés d'un mécanisme permettant de prolonger leur durée de vie et leur potentiel de réplication, véritables garants de leurs fonctions immunitaires. Toutefois, lorsque les lymphocytes T humains en culture sont stimulés de manière répétitive, une diminution progressive de l'activité de la télomérase est observée (Weng et al., 1997). Ces résultats expliquent que les lymphocytes perdent progressivement les télomères. Ainsi, les lymphocytes ont une durée de vie qui est limitée par un nombre défini de divisions cellulaires (Effros and Pawelec, 1997) et des clones T sénescents, avec des télomères extrêmement courts, sont observés après quelques mois de culture cellulaire *in vitro* (Rufer et al., 2001). L'activité de la télomérase permettrait la prolongation du potentiel réplicatif des lymphocytes T humains, mais non leur immortalisation.

3.4.4.4. Rôle du statut tabagique

La consommation de tabac engendre un stress oxydant et une inflammation, deux mécanismes qui participent activement à l'attrition des télomères humains. Plusieurs études se sont penchées sur l'influence que pourrait avoir le statut tabagique sur la longueur des télomères. Chez une population féminine de 1122 sujets, une association négative significativement entre la longueur des télomères leucocytaires, le passé tabagique des sujets, ainsi que l'index de masse corporelle (IMC) (Valdes et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par Morlà et al. (Morlá et al., 2006). De même, la longueur des télomères leucocytaires pourrait être considérée comme un marqueur cumulatif du stress oxydant, notamment en lien avec le tabac (Babizhayev et al., 2011).

L'activité télomérase, augmentée dans les carcinomes broncho-pulmonaires (Wu and Hansen, 2001), l'est également chez les fumeurs en corrélation avec la quantité de tabac fumé (nombre de paquets-année) (Getliffe et al., 2005).

3.4.4.5. Effets des polluants

L'effet des PM_{2.5} sur la longueur des télomères est relativement peu documenté et les résultats des études parfois contradictoires. Ainsi, l'exposition de travailleurs en aciérie à des particules riches en métaux conduit à une augmentation de la longueur des télomères dans les leucocytes (Dioni et al., 2011), alors qu'une érosion des télomères associée au stress oxydant induit par les particules a été décrite (Grahame and Schlesinger, 2012) et que la longueur des télomères des lymphocytes périphériques de travailleurs exposés aux HAP est réduite (Pavanello et al., 2010). Concernant certains éléments chimiques pris isolément, le cadmium semble induire une augmentation de l'activité télomérase dans les hépatocytes de rat (Dai et al., 2010a). Il semblerait en revanche que la TCDD puisse favoriser une diminution de l'activité télomérase dans certaines conditions (Fiorito et al., 2014).

3.5. Instabilité chromosomique, oncogènes et suppresseurs de tumeur

La littérature suggère qu'un nombre varié et séquentiel d'altérations génétiques sont nécessaires à la conversion de cellules épithéliales bronchiques normales en cellules cancéreuses malignes. Parmi ces altérations, beaucoup sont communes aux deux groupes histologiques principaux : les cancers bronchiques non à petite cellule (NSCLC) et les cancers du poumon à petites cellules.

3.5.1. Instabilité chromosomique

En contraste avec les désordres hématologiques souvent caractérisés par des aberrations chromosomiques simples et équilibrées, les tumeurs épithéliales ont toujours des anomalies chromosomiques complexes et non équilibrées, notamment dans le cancer du poumon (Testa et al., 1997).

La première aberration récurrente décrite dans les carcinomes pulmonaires à petites cellules est la délétion en 3p (Whang-Peng et al., 1982). Cette délétion est fréquemment retrouvée dans tous les sous types de cancer du poumon. En effet, la perte d'hétérozygotie et/ou des délétions homozygotes en 3p ont été détectées dans quasiment 100 % des SCLC et des NSCLC (Tableau 7). Cette région génomique semble donc jouer un rôle important dans les étapes précoces de la cancérogénèse pulmonaire. Le gène FHIT (Fragile Histidine Triad) situé en 3P14.2 est fréquemment délété ou muté dans les cancers du poumon où il représente la délétion la plus précoce dans les lésions bronchiques préneoplasiques.

D'autres anomalies caryotypiques récurrentes ont été rapportées dans les SCLC : del(5q), del(13q) et del(17p), etc. Quant aux NSCLC, ces altérations cytogénétiques sont encore plus complexes (Panani and Roussos, 2006) (Tableau 7).

Tableau 7 : Loci fréquemment touchés par des pertes d'hétérozygotie dans les différents types de cancers broncho-pulmonaires (d'après Lantuéjoul et al., 2009; Yokota and Kohno, 2004).

SCC : Squamous Cell Carcinoma ; ADC : Adénocarcinome ; SCLC : Small Cell Lung Cancer.

Chromosome et Bras	Région	Gène cible	Fonction du gène	SCC	ADC	SCLC
2q	?	?			x	
3p	3p14.2	<i>FHIT</i>	Activation de l'apoptose	x	x	x
3p	3p21.31	<i>RASSF1</i>	Régulateur cycle cellulaire	x	x	x
5q	5q21	<i>APC</i>	Rôle dans la migration	x		x
9p	9p21	<i>P16^{INK4A}</i>	Régulateur cycle cellulaire	x	x	
13q	13q14	<i>RB</i>	Régulateur cycle cellulaire	x	x	x
17p	17p13.1	<i>TP53</i>	Maintien de l'intégrité du génôme	x	x	x
18q	18q21	<i>SMAD2</i>	Régulateur cycle cellulaire		x	
18q	18q21	<i>SMAD4</i>	Régulateur cycle cellulaire		x	
22q	22q12.1	<i>MYO18B</i> ?	?		x	x

3.5.2. Oncogènes et signaux de prolifération

L'homéostasie d'un tissu ou d'un organe, au sein d'une population cellulaire normale, nécessite un strict équilibre de la balance entre les gènes de prolifération, favorisant la division et / ou la survie cellulaire (proto-oncogènes) et les gènes anti-prolifératifs (gènes suppresseurs de tumeurs) ralentissant la progression du cycle cellulaire permettant la réparation des dommages à l'ADN et / ou induisant l'apoptose. La rupture de cet équilibre, par apparition de mutations au sein des cellules épithéliales de l'arbre bronchique en réponse à une exposition aux carcinogènes du tabac, peut transformer cet épithélium bronchique normal en tissu potentiellement cancéreux.

Les proto-oncogènes codent pour des protéines qui interviennent dans la transmission de signaux de prolifération. Ce sont des facteurs de croissance et leurs

récepteurs, des protéines membranaires transductrices de signaux, des facteurs de transcription ou des protéines régulant le cycle cellulaire. Dans la cellule tumorale, la dérégulation de l'expression de ces gènes suite à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques, ou encore suite à des altérations épigénétiques conduit à leur activation constitutive et à leur fonction oncogénique proprement dite. Ces modifications donnent la capacité aux oncogènes d'induire la transformation tumorale seuls ou en coopération, certains étant capables d'immortaliser une cellule (c-Myc) ou d'induire l'émergence du phénotype tumoral (Ras). De nombreux oncogènes ont été identifiés (Osada and Takahashi, 2002; Sekido et al., 2003; Shigematsu and Gazdar, 2006).

3.5.3. Gènes suppresseurs de tumeurs et inhibiteurs de croissance

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur est l'une des étapes les plus précoces de la cancérogénèse bronchique. Ces gènes exercent à l'état normal une fonction régulatrice négative sur la prolifération cellulaire (Weinberg, 1991). Ils codent pour des protéines qui ont la capacité de prévenir l'effet des oncogènes et d'inhiber le phénotype tumoral d'où le nom qui leur a été donné de gènes suppresseurs de tumeurs. Leur inactivation confère à la cellule un avantage prolifératif. Les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être inactivés (mutation ou dérégulation épigénétique) ou éliminés (délétion ou perte d'hétérozygotie) pour libérer la cellule de leur « surveillance ». Au cours du processus de la cancérogénèse pulmonaire, les gènes suppresseurs de tumeur préférentiellement inactivés codent pour des protéines appartenant aux deux grandes voies de signalisation des protéines *P16INK4a/Rb* et *P14ARF/TP53* (Osada and Takahashi, 2002; Sekido et al., 2003). Ce sont deux voies de régulation clés car elles contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome via leur implication dans les points de contrôle des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. En réponse à un stress (ex : dommages de l'ADN), elles vont induire un arrêt du cycle (afin de réparer l'ADN endommagé) et / ou l'apoptose (si la cellule est incapable de prendre en charge ces lésions).

3.6. Mécanismes épigénétiques

3.6.1. Organisation structurale de l'ADN

La molécule d'ADN étant très longue (environ 2 mètres par cellule humaine), elle doit être compactée afin de pouvoir être contenue dans le noyau des cellules eucaryotes. L'ADN est ainsi associé à des protéines pour former une structure plus compacte, la chromatine chez les eucaryotes, ou le nucléoïde chez les procaryotes (Figure 28). La mise en place de cette structure permet à la fois de condenser et protéger l'ADN, mais aussi d'organiser l'information génétique dans le noyau et de réguler son accessibilité aux différentes machineries cellulaires. Chez les eucaryotes, les protéines structurales de la chromatine sont les histones.

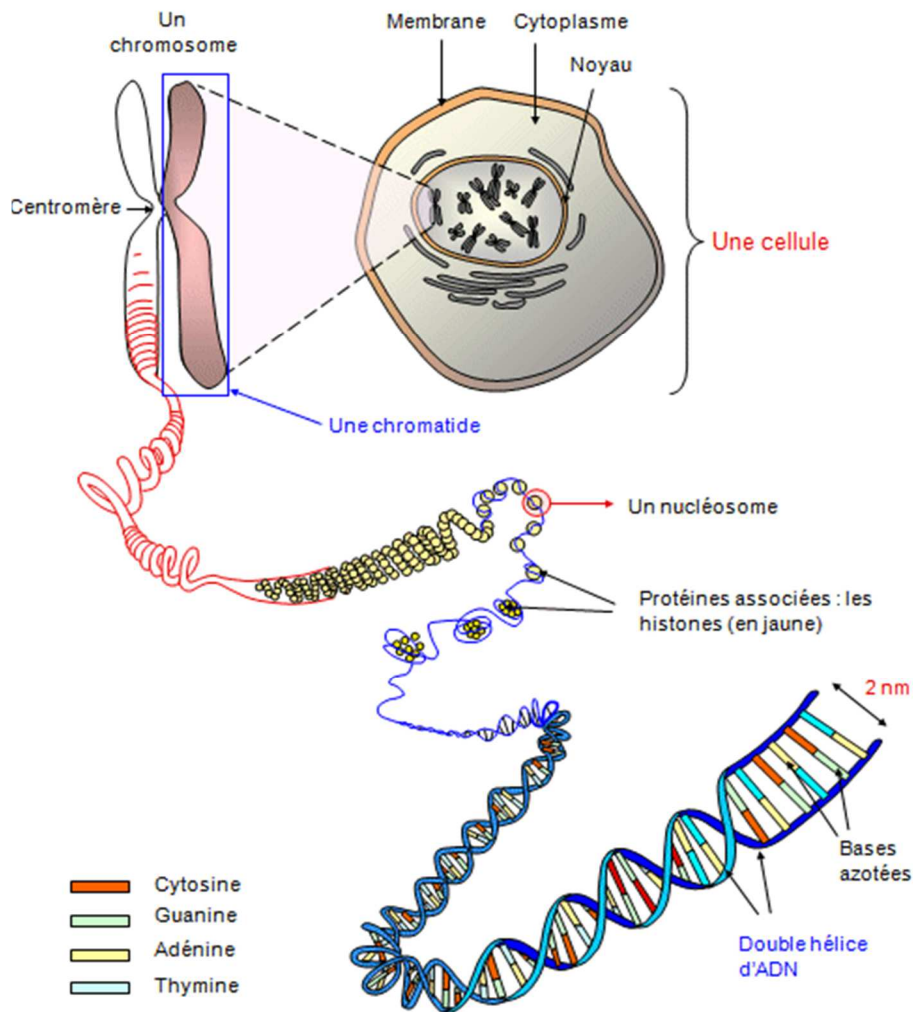


Figure 28 : Différents niveaux de compaction de l'ADN (adapté de National Human Genome Research, 2008).

Les histones sont des protéines basiques de petite taille (10 à 23 kD) très conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes, et sont les constituants primaires de la chromatine. L'ADN s'enroule autour d'un octamère protéique constitué, en règle générale, de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, pour former le nucléosome de cœur, l'unité de base et répétitive de la chromatine (Luger et al., 1997). Chaque nucléosome de cœur contient 145 à 147 paires de bases (pb) d'ADN, et se retrouve toutes les 200 +/- 40pb le long du génome. Ces cœurs sont stabilisés par l'histone H1, une histone de liaison permettant de les relier entre eux. L'ensemble constitue ainsi le nucléosome, et induit une compaction de l'ADN d'un facteur 30 à 40 (Luger et al., 1997) (Figure 29).

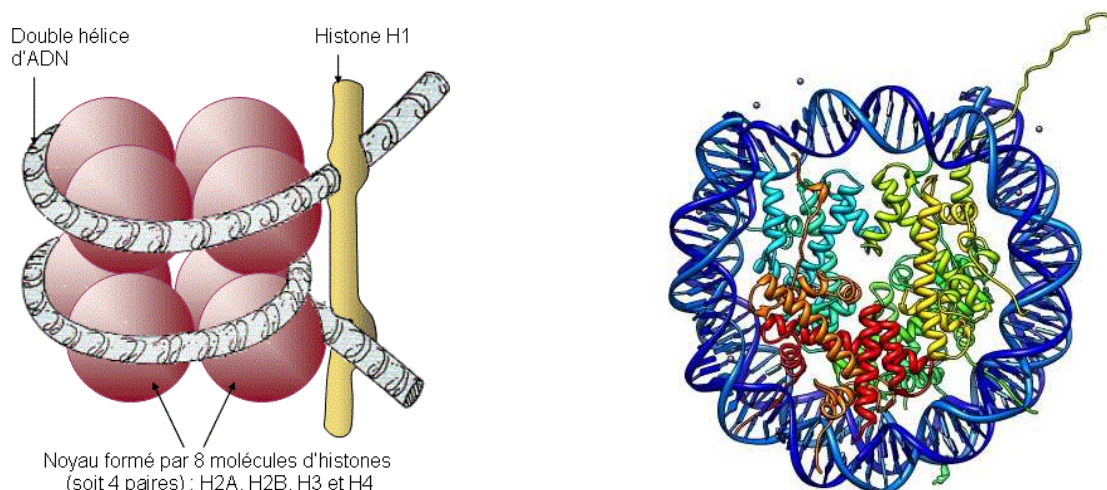


Figure 29 : Nucléosome (Luger et al., 1999).

L'enchaînement des nucléosomes constitue une fibre de 11 nm de diamètre, le nucléo filament, qui représente le premier niveau de compaction de la chromatine. Le nucléo filament peut subir des niveaux de compaction supplémentaires, selon l'avancement du cycle cellulaire (interphase ou mitose), ou son activité (réplication ou transcription). Dans le noyau interphasique, il se condense pour former une fibre de 30 nm de diamètre, qui peut s'organiser en boucles plus ou moins repliées. Le chromosome métaphasique représente le niveau de compaction ultime.

3.6.2. Modifications post-traductionnelles des histones

Les extrémités aminotermiales des histones, et dans une moindre mesure carboxyterminales, sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination sont les plus étudiées (Figure 30). Cependant, d'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP ribosylation, la sumoylation, la glycosylation ou la biotinylation. Les modifications des histones modulent la structure de la chromatine, permettant de contrôler les fonctions cellulaires liées à l'ADN, telles que la transcription, en réponse à des changements physiologiques dans la cellule. L'importance des modifications post-traductionnelles des histones est révélée par le fait que les mécanismes épigénétiques sont essentiels au développement harmonieux de l'organisme et que leur dérégulation peut entraîner différentes pathologies, notamment le cancer (Loizou et al., 2006).

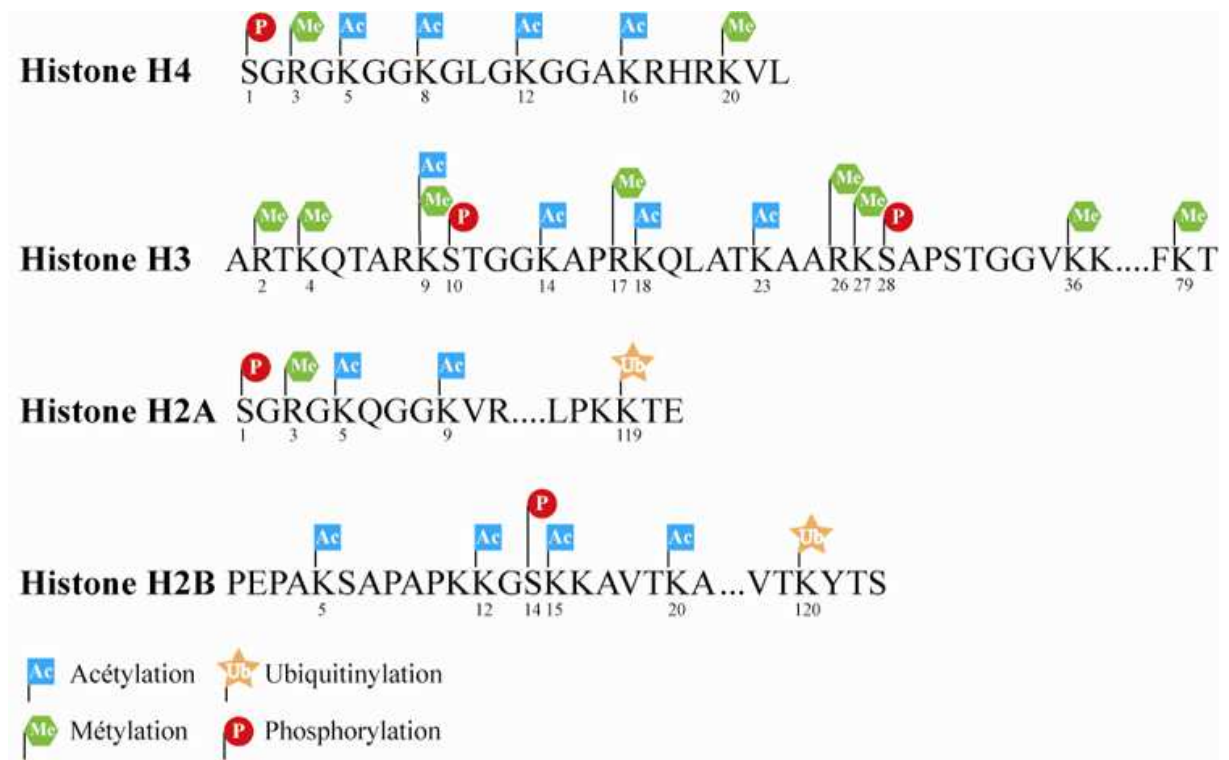


Figure 30 : Résidus des histones sujets à des modifications post-traductionnelles chez les mammifères (Lacoste and Côté, 2005).

Une des modifications particulièrement étudiée est la phosphorylation du variant d'histone H2AX. En effet, l'un des premiers événements qui se produit après l'induction

de cassures double brin est la phosphorylation de H2AX autour des cassures double brin sur la sérine 139 appelé alors γ -H2AX. La phosphorylation de H2AX peut se propager sur plusieurs mégabases autour de la cassure double brin formant des foyers visualisables en microscopie (Rogakou et al., 1998, 1999). Cette marque est un acteur clé de la signalisation des dommages puisqu'elle médie le recrutement et/ou la rétention de nombreuses protéines impliquées dans la gestion des cassures double brin.

3.6.2.1. Effets des polluants

Différents contaminants environnementaux sont susceptibles d'altérer les modifications post-traductionnelles d'histones (Tableau 8).

Tableau 8 : Modifications post traductionnelles d'histones liés à différents polluants

(**Nickel** (Broday et al., 2000; Chen et al., 2006; Karaczyn et al., 2006; Ke et al., 2006; Zhou et al., 2009), **Chrome** (Wang et al., 2012; Zhou et al., 2009), **Arsenic** (Chervona et al., 2012; Zhou et al., 2008, 2009), **Benzo(a)pyrene (B[a]P)** (Schnekenburger et al., 2007), **PM** (Cantone et al., 2011; Donaldson et al., 2003)).

Xénobiotiques	Cellules	Histones	Modifications post-traductionnelles	Références
Nickel	A549	<ul style="list-style-type: none"> H3K9 H2A et H2B H4K12 H3K4 	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation mono- et diméthylation Augmentation ubiquitination Diminution acétylation Augmentation triméthylation 	<ul style="list-style-type: none"> Chen et al., 2006 Ke et al., 2006; Karaczyn,2006 Broday et al.,2000 Zhou et al.,2009
Chrome	A549	<ul style="list-style-type: none"> H3K9 H3K4 H3 et H4 	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation diméthylation Augmentation triméthylation Diminution acétylation 	<ul style="list-style-type: none"> Zhou et al., 2009 Zhou et al., 2009 Wang et al., 2012
Arsenic	A549	<ul style="list-style-type: none"> H3K9 H3K4 H3K27 H3K18 	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation diméthylation Augmentation triméthylation Diminution triméthylation Augmentation ou diminution acétylation 	<ul style="list-style-type: none"> Zhou et al., 2009 Zhou et al., 2009 Zhou et al., 2008 Chervona et al., 2012
B[a]P	A549	<ul style="list-style-type: none"> H3S10 H3K4 H3K14 H3K16 H3K4 	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation phosphorylation 	<ul style="list-style-type: none"> Schnekenburger et al., 2007
PM	A549	<ul style="list-style-type: none"> H4 H3K4 	<ul style="list-style-type: none"> Augmentation acétylation Augmentation triméthylation 	<ul style="list-style-type: none"> Donaldson et al., 2003 Cantone et al., 2011

3.6.3. Micro-ARN et expression génique

Initialement découverts chez *Caenorhabditis elegans*, en 1993, les micro-ARN (miRNA) sont des ARN non codants de 21 à 23 nucléotides de long, régulateurs de l'expression génique (Malleter et al., 2012).

Les miRNA contrôlent de nombreux processus physiologiques, par exemple le développement, la différenciation et la prolifération cellulaires, l'apoptose, la réponse au stress ou encore divers processus oncogéniques (Kim, 2005). Certains miRNA ont des fonctions essentielles dans le développement et contrôlent la différenciation cellulaire dans divers tissus. De plus, les miRNA pourraient être impliqués dans la surveillance des profils d'expression génique et le filtrage des bruits transcriptionnels, assurant l'identité tissulaire et, de ce fait, seraient les garants de l'exactitude des programmes d'expression au cours du développement (Stark et al., 2005). Bien que leur nombre ne cesse de croître (24 521 en juin 2013, Kozomara and Griffiths-Jones, 2013) et que leurs fonctions régulatrices se diversifient, le rôle des miRNA dans les pathologies humaines est encore mal compris.

3.6.3.1. Micro-ARN et PM_{2.5}

Nous nous appuyerons sur deux exemples d'exposition à des particules spécifiques afin d'illustrer les effets potentiels des PM_{2.5} sur l'expression des miRNA, leur diversité rendant une liste exhaustive impossible à dresser.

Une étude menée par Jardim et al. a étudié l'expression de 723 miRNA dans des cellules épithéliales bronchiques humaines en culture primaire exposées à des particules diesel (Diesel Exhaust Particles, DEP) en interface air-liquide (Jardim et al., 2009). Les auteurs ont mis en évidence une modulation (induction ou inhibition) d'un facteur supérieur à 1,5 de 197 miRNA, sur les 313 détectés. De manière intéressante, les auteurs ont identifié 12 miRNA modulés d'un facteur supérieur à 4, permettant de dégager des réseaux d'interaction correspondant à l'inflammation et à la tumorigenèse. Notons que parmi les miRNA d'intérêt figurent miR-26b et miR-27a, tous deux inhibés après exposition aux DEP. Cette étude révèle l'amplitude de l'effet des DEP sur l'expression de

miRNA, suggérant qu'une réponse aussi étendue pourrait être observée après exposition de cellules épithéliales bronchiques aux PM_{2.5}. De plus, les miRNA les plus fortement modulés par les DEP apparaissent comme des candidats intéressants dans l'étude des effets des PM_{2.5}.

Une deuxième étude menée sur 63 individus travaillant en aciérie a recherché l'expression de trois miRNA (miR-222, miR-21 et miR-146a) dans des leucocytes avant et après exposition professionnelle à des PM₁₀ riches en métaux (Bollati et al., 2010). miR-21, un miRNA associé à la réponse au stress oxydant surexprimé dans de nombreux cancers, a vu son expression significativement augmenter après exposition à des particules diesels (Kanwal and Gupta, 2010). Bien que n'ayant été conduite que sur trois cibles, cette étude souligne la plausibilité d'un effet des PM_{2.5} sur l'expression de miRNA dans le cadre d'une exposition humaine réelle.

3.6.4. Méthylation de l'ADN

3.6.4.1. Mécanismes de méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la mieux caractérisée, associée surtout à la répression transcriptionnelle. Elle résulte de réactions chimiques catalysées par les ADN méthyltransférases (DNMT), dans lesquelles un groupement méthyle, fourni par la S-adénylméthionine (SAM), est ajouté à une cytosine pour donner une méthylcytosine (Herman and Baylin, 2003) (Figure 31).

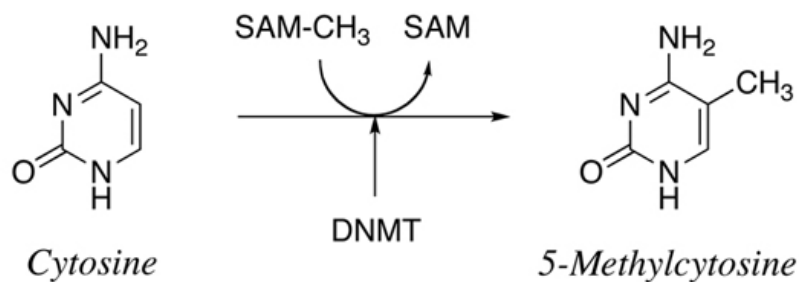


Figure 31 : Conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine par la méthyltransférase (Gibney and Nolan, 2010).

SAM : S-adénylméthionine, DNMT : ADN méthyltransférases.

Chez les mammifères, cette modification n'affecte que les cytosines suivies d'une guanine dans la séquence d'ADN (les sites ou dinucléotides CpG). La fréquence des dinucléotides CpG dans le génome humain est considérablement inférieure à la fréquence théorique. Ce phénomène résulterait de l'hypermutableté des cytosines méthylées qui, par désamination, se transforment en thymines (Herman and Baylin, 2003). Ce phénomène de suppression CG est évident tout le long du génome humain à l'exception de quelques régions où la fréquence des sites CpG est identique ou significativement supérieure à la théorie. Ces régions, appelées îlots CpG, se retrouvent fréquemment au niveau des régions promotrices des gènes (environ 50% des gènes chez l'homme sont riches en dinucléotides CpG), sont typiquement non méthylées (alors que 70 à 80 % de tous les sites CpG sont méthylés chez l'homme) et échappent ainsi à la mutation cytosine-thymine (Herman and Baylin, 2003).

Il faut noter que les îlots CpG des promoteurs demeurent non méthylés même quand le gène n'est pas en voie de transcription. Dans de rares cas, ces îlots deviennent méthylés et les gènes qui y sont associés connaissent alors une extinction permanente, transmise aux cellules filles pendant la mitose (Herman and Baylin, 2003).

3.6.4.1.1. Méthylation *de novo* de l'ADN

Lorsqu'on se réfère à l'établissement d'un profil de méthylation dans le génome, on parle d'une méthylation *de novo* de l'ADN. Celle-ci a lieu pendant la gastrulation de l'embryon et suit la vague de déméthylation du génome parental qui survient quelques heures après la fécondation. La méthylation *de novo* se manifeste rarement après la gastrulation au cours du développement normal. Toutefois, elle est fréquemment rencontrée durant l'établissement des lignées cellulaires *in vitro* et dans les tumeurs malines *in vivo*. Les deux principales enzymes responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN sont DNMT3A et DNMT3B (Jaenisch and Bird, 2003) (Figure 32).

3.6.4.1.2. Méthylation de maintien de l'ADN

La méthylation de maintien décrit les processus qui reproduisent les profils de méthylation dans les différentes générations cellulaires (Bird, 2002) ; pendant la réplication, le statut de méthylation est transmis aux brins d'ADN fils grâce à l'ADN méthyltransférase de maintien DNMT1, laquelle est présente au niveau de la fourche de réplication et reconnaît les sites CpG hémiméthylés (Figure 32). Ainsi, le profil de méthylation est fidèlement copié dans l'ADN nouvellement synthétisé au cours des différentes réplifications des cellules somatiques (Miyamoto and Ushijima, 2005).

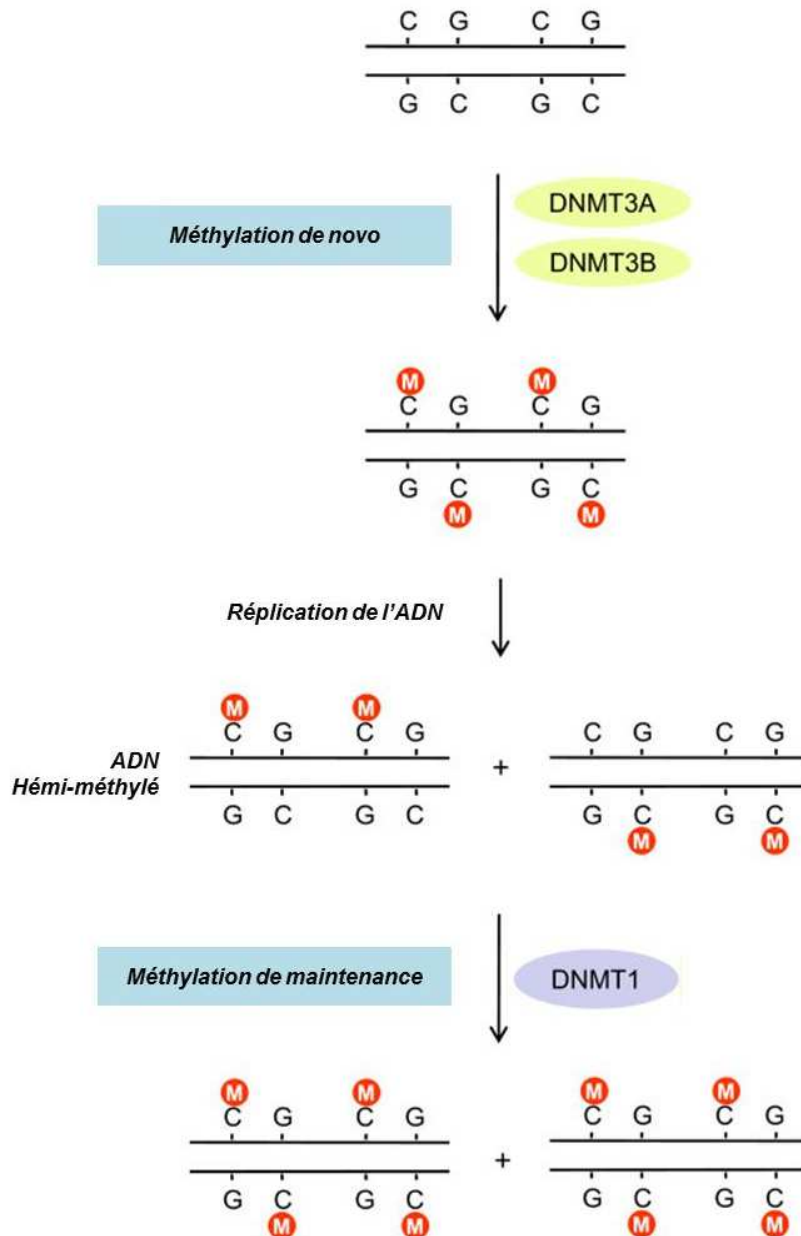


Figure 32 : Méthylation de novo et de maintenance (Yu et al., 2011).

3.6.4.2. Méthylation de l'ADN et pathologies cancéreuses

Le profil de méthylation des promoteurs de nombreux gènes cruciaux est altéré au cours de la tumorigenèse. Ces altérations conduisent à une perte d'expression de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par une hyperméthylation de leur promoteur (Herman, 2004; Schwartz et al., 2007) ou, à l'inverse, à une activation de la transcription de certains oncogènes dont le promoteur devient hypométhylé (Gaykalova et al., 2012; Hur et al., 2013) (Figure 33).

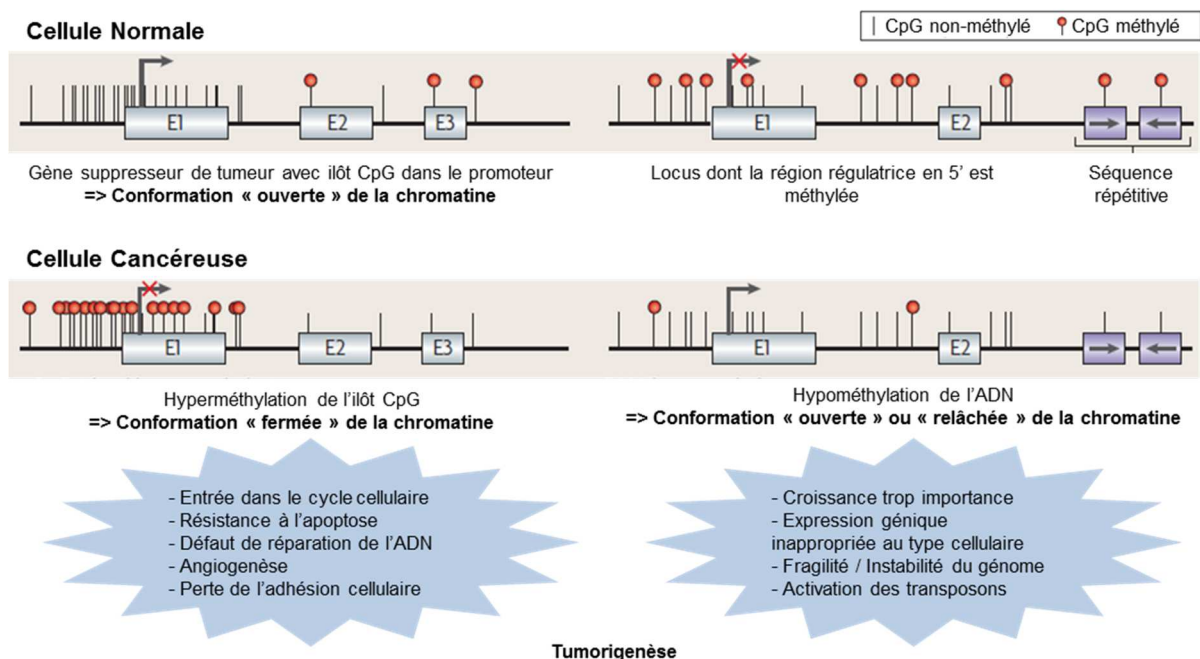


Figure 33 : Différence de profil de méthylation entre les cellules normales et cancéreuses (adapté de Esteller, 2007).

E1 : Exon 1.

De nombreux gènes suppresseurs de tumeur sont ainsi « éteints » au cours de la cancérogenèse broncho-pulmonaire (Tableau 9), tels que $P16^{INK4A}$ ou le gène *O6-MethylGuanine-DNA MethylTransferase (MGMT)*.

La protéine $P16^{INK4a}$, suppresseur de tumeur majeur, est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la cellule. Les conséquences d'une dérégulation de l'expression du gène $P16^{INK4a}$ peuvent donc être multiples, comme en témoignent la très fréquente association de sa délétion (Nobori et al., 1994) ou de son inactivation par méthylation (Merlo et al., 1995) avec les processus cancéreux, ou encore l'apoptose rapide provoquée par son hyperexpression (Ausserlechner et al., 2005; Sandig et al., 1997).

L'O6-méthylguanine DNA méthyltransférase (MGMT) est une enzyme de réparation de l'ADN qui joue un rôle important dans l'élimination des lésions induites par des agents cancérogènes. Le silence épigénétique du gène *MGMT* suite à la méthylation de son promoteur entraîne une défaillance de l'enzyme MGMT. De façon physiologique,

l'activité de cette enzyme diminue avec l'âge (Aoki et al., 1993). Des travaux montrent que *MGMT* joue ainsi un rôle dans la prévention des cancers dans le cas d'une exposition aux agents alkylants (Souliotis et al., 1991). De faibles niveaux d'expression de *MGMT* sont d'autre part associés à une augmentation du taux de mutation de G vers A dans des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes tels que K-ras pour le cancer du côlon, les cancers du poumon non à petites cellules et les cancers gastriques (Esteller et al., 2001; Nakamura et al., 2001). Cette modification épigénétique du promoteur de *MGMT*, associée à une diminution de l'expression du gène, est un événement précoce et répandu dans la cancérogenèse (Esteller et al., 1999; Herman and Baylin, 2003).

Tableau 9 : Gènes suppresseurs de tumeur fréquemment hyperméthylés dans les cancers broncho-pulmonaires, regroupés par fonction (adapté de Chen et al., 2011).

NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer, *SCLC* : Small Cell Lung Cancer.

Fonction	Gène	Fréquence de méthylation	Type de cancer
Adhésion & Matrice Extra-Cellulaire	<i>T-cadherin</i>	28 - 30 %	NSCLC
	<i>E-cadherin</i>	12 - 34 %	NSCLC
	<i>TIMP3</i>	13 %	NSCLC
	<i>TIMP4</i>	94 %	NSCLC
Prolifération & Régulation du Cycle Cellulaire	<i>P16^{INK4A}</i>	22 - 47 %	NSCLC
	<i>P14^{ARF}</i>	30 %	NSCLC
	<i>FHIT</i>	34 - 47 %	NSCLC
	<i>RARβ2</i>	26 - 45 %	NSCLC
	<i>APC</i>	30 - 53 %	NSCLC
Apoptose	<i>Fas</i>	40 %	SCLC
	<i>CASP8</i>	52 %	SCLC
	<i>DAPK</i>	26 - 45 %	NSCLC
Réparation de l'ADN	<i>MGMT</i>	20 %	NSCLC
	<i>BRCA1</i>	30 %	NSCLC
	<i>BRCA2</i>	42 %	NSCLC
Signalisation	<i>RASSF1A</i>	25 - 45 %	NSCLC
	<i>PTEN</i>	26 %	NSCLC

3.6.4.3. Influence de l'âge

Les mécanismes communs au cancer et au vieillissement ne sont pas seulement de nature génétique ; ils sont aussi de nature épigénétique. De fait, certaines altérations

épigénétiques caractéristiques du cancer sont identiques à celles que l'on rencontre au cours du vieillissement (Fraga et al., 2005).

Le niveau de méthylation globale de l'ADN diminue avec le vieillissement alors que la méthylation des îlots CpG des promoteurs des gènes augmente. Des altérations identiques ont été décrites dans les cellules cancéreuses. Les modifications du niveau de méthylation de l'ADN au cours du vieillissement pourraient contribuer à provoquer une modification de l'expression des gènes nécessaires au fonctionnement normal de la cellule (Fraga et al., 2007).

La protéine P16^{INK4a} inhibe la progression du cycle cellulaire (cyclin dependent kinase inhibitor : CDKI) en stoppant le cycle cellulaire à la phase G1/S. Les cellules sont alors dans un état non prolifératif. L'expression de P16^{INK4a} est augmentée dans la plupart des tissus sénescents chez les rongeurs à un âge avancé, en faisant ainsi un marqueur fiable de vieillissement cellulaire chez les mammifères (Krishnamurthy et al., 2004). Plus précisément, au niveau vasculaire, d'autres travaux ont également montré l'augmentation de l'expression de P16^{INK4a}, traduisant aussi la présence de cette protéine dans le vieillissement cellulaire au niveau de cellules musculaires lisses vasculaires (Rodriguez-Menocal et al., 2010). Il est également intéressant de noter que P16^{INK4a} est aussi significativement augmentée dans des modèles murins de vieillissement prématuré (vieillissement induit par un stress) (Sun et al., 2004), et que l'expression de P16^{INK4a} est corrélée avec une prolifération altérée des cellules souches hématopoïétiques (Lewis et al., 2001; Meng et al., 2003). Ce dernier point souligne également le fait que P16^{INK4a} peut être un effecteur du vieillissement en plus d'être un biomarqueur, en inhibant le renouvellement des cellules souches.

L'activité de l'O6-méthylguanine DNA méthyltransférase a été mesurée dans des hépatocytes murins mis en culture. L'activité de MGMT diminue significativement avec l'âge (Aoki et al., 1993). Une autre étude a montré que si le gène codant pour MGMT était surexprimée chez des souris transgéniques, il y avait une réduction significative des carcinomes hépatocellulaires par rapport aux souris du même âge (Walter et al., 2001).

Ce résultat a été confirmé par un autre travail qui a mis en évidence une diminution significative dans l'apparition et dans la progression des tumeurs spontanées chez les souris *MGMT* mutées par rapport aux souris sauvages et ce, même en cas de vieillissement accéléré (Anisimov, 2003).

3.6.4.4. Rôle du statut tabagique

La fumée de cigarette est considérée comme l'un des médiateurs environnementaux puissants de méthylation de l'ADN (Breitling et al., 2011).

Les substances cancérigènes contenues dans la fumée de cigarette, tels que l'arsenic, le chrome, le formaldéhyde, les HAP et les nitrosamines (Suter et al., 2010), peuvent endommager l'ADN en provoquant des cassures double brin, comme indiqué dans des souches de cellules embryonnaires de souris exposées à la fumée de cigarette (Huang et al., 2012) . Dans cette étude, les cellules qui ont résisté affichent une forte capacité de réparation de l'ADN et un caryotype normal (Huang et al., 2012). Les sites de réparation de l'ADN recrutent la DNMT1 (Mortusewicz et al., 2005), qui méthyle les CpG adjacents aux nucléotides réparés (Cuozzo et al., 2007).

La fumée de cigarette peut aussi modifier indirectement méthylation de l'ADN. Les condensats de la fumée de cigarette augmente l'expression de Sp1, facteur de transcription qui se lie aux promoteurs des gènes (Di et al., 2012; Mercer et al., 2009). Il peut alors empêcher la méthylation de novo des CpG au sein de ces motifs lors de l'embryogenèse précoce (Han et al., 2001).

Enfin, la fumée de cigarette peut modifier la méthylation de l'ADN par l'intermédiaire d'une hypoxie due au CO qui entre en compétition avec l'oxygène en se liant à l'hémoglobine (Olson, 1984). L'hypoxie conduit alors à l'augmentation de la synthèse d'un métabolite, la S-adénosylméthionine, acteur majeur dans la méthylation de l'ADN (Liu et al., 2011).

3.6.4.5. Effets des polluants

Différents agents chimiques retrouvés dans les PM_{2.5} considérés isolément ou au sein des particules sont capables de modifier la méthylation de l'ADN.

Plusieurs études *in vitro* ont ainsi mis en évidence des modifications du profil de méthylation de l'ADN. Une hypométhylation globale suivie d'une hyperméthylation a été observée après exposition au cadmium de cellules hépatiques de rat (une semaine d'exposition à 2,5 µM de cadmium) (Takiguchi et al., 2003).

L'exposition à l'arsenic est quant à elle susceptible d'induire, selon les études, une hypométhylation globale dans des cellules hépatiques de rat, ou encore l'apparition de zones hypo- ou hyper-méthylées, ainsi qu'une hyperméthylation du promoteur de *TP53* dans des cellules A549 (Mass and Wang, 1997; Zhao et al., 1997; Zhong and Mass, 2001).

Différentes études chez l'animal ont permis de mettre en évidence une hypométhylation globale de l'ADN après exposition de souris à l'arsenic (Chen et al., 2004), ainsi qu'une hyperméthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* après exposition au nickel (Govindarajan et al., 2002).

Les promoteurs de différents gènes sont hyperméthylés après exposition à certaines molécules contenues dans les PM_{2.5}, à savoir *TP53* après exposition à l'arsenic (Chanda et al., 2006), *P15* après exposition au benzène (Bollati et al., 2007) et *P16^{INK4A}* après exposition à l'arsenic (Chanda et al., 2006), à des dérivés du chrome (Kondo et al., 2006), aux produits de combustion du charbon (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2007), ou à des PM_{2.5} riches en métaux (Hou et al., 2011) ou d'origine urbaine (Soberanes et al., 2012).

De manière surprenante, certains auteurs ont mis en évidence une hypométhylation du gène suppresseur de tumeur *MGMT* après exposition aux HAP (Duan et al., 2013), ainsi qu'une hyperméthylation globale de l'ADN après exposition à l'arsenic (Pilsner et al., 2007).

3.6.5. Interactions entre les différents mécanismes épigénétiques

Même si les trois mécanismes épigénétiques connus (modifications post-traductionnelles d'histones, méthylation d'ADN et Micro-ARN) ont été décrits de manière individuelle dans les paragraphes précédents, il est important de souligner que ces mécanismes interagissent au niveau cellulaire pour aboutir à la régulation de l'expression génique.

Cette interaction est particulièrement importante dans le contrôle de la transcription, déterminée à la fois par la méthylation de l'ADN et par les modifications post-traductionnelles d'histones, et perturbée dans les cellules tumorales (Figure 34). Ainsi, au cours de la cancérogenèse, l'inversion du profil de méthylation décrite précédemment empêche la présence des HAT au niveau des îlots CpG de promoteurs et conduit au recrutement de DNMT et d'HDAC, qui aboutit à un changement des modifications post-traductionnelles d'histones d'un état acétylé vers un état méthylé. Associée au recrutement de corépresseurs transcriptionnels, cette modification simultanée de plusieurs marques épigénétiques conduit au verrouillage de la transcription dans la zone ciblée (Deltour et al., 2005).

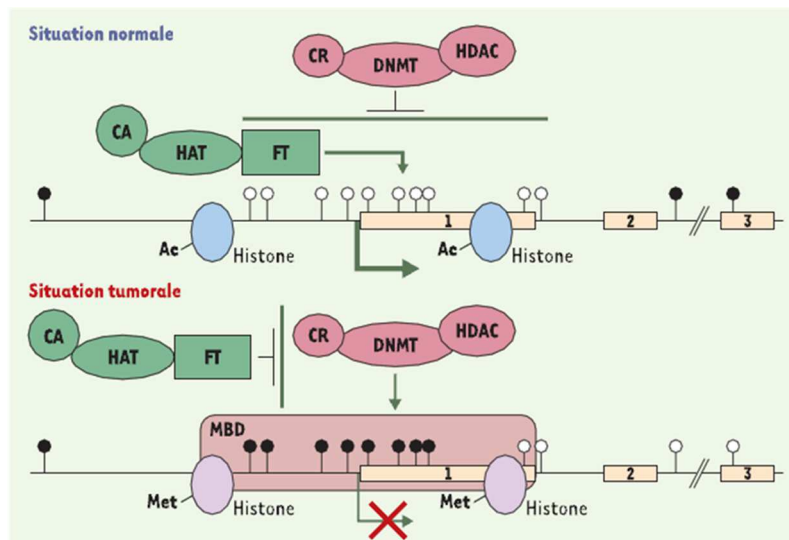


Figure 34 : Coopération entre les mécanismes épigénétiques dans la régulation de la compaction de la chromatine (Deltour et al., 2005).

Les îlots CpG méthylés sont représentés par des cercles noirs, les CpG non-méthylés par des cercles blancs.

CA : Co-Activateurs transcriptionnels ; CR : Co-Répresseur transcriptionnel ; FT : Facteur de Transcription ; HAT : Histone AcétylTransférase ; HDAC : Histone DésAcétylase ; MBD : Methyl-CpG Binding Domain.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Le tabac reste encore aujourd'hui le principal facteur de risque de cancer du poumon. Considérant la classification récente de la pollution de l'air extérieur comme cancérigène certain pour l'Homme (Groupe 1) par le Centre International de Recherches sur le Cancer, la question de la pollution atmosphérique devient également un enjeu majeur de santé publique. En effet, avec 800 000 décès annuels (OMS, 2002, 2009), la pollution de l'air est un véritable problème mondial. Parmi les polluants de l'air extérieur, les particules représentent un problème toxicologique complexe. Les plus fines, dont le diamètre est inférieur à 2,5 μm , sont capable de pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles peuvent être retenues ou transloquer vers la circulation systémique. L'association tabac-particules fines, dont la composition chimique est proche, peut entraîner une synergie de leurs effets nocifs. L'agglomération Dunkerquoise, plus grand émetteur de particules de la région Nord Pas-de-Calais, est, de ce fait, un site d'étude de la pollution atmosphérique particulièrement pertinent. Par ailleurs, même si l'ensemble de la population peut subir les conséquences d'une exposition aux polluants de l'air, les personnes âgées, également les plus touchées par les pathologies cancéreuses, sont plus sensibles à l'action des polluants atmosphériques.

Face à ces constats, deux questions importantes nous semblent émerger :

- **Comment l'âge peut-il influencer la toxicité $\text{PM}_{2.5}$ dans l'apparition de mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse broncho-pulmonaire ?**
- **Le statut tabagique est-il également susceptible de modifier la toxicité des $\text{PM}_{2.5}$?**

Pour répondre à ces questions, nous avons prélevé des $\text{PM}_{2.5}$ à Dunkerque au cours de la saison printemps-été 2011. Nous avons bénéficié d'une caractérisation physico-chimique détaillée des échantillons de particules réalisée en amont de ce travail.

Par la suite, nous nous sommes fixé pour objectif d'apporter des éléments de réponse aux questions posées en étudiant *in vitro* :

- **la capacité des PM_{2.5} collectées à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancérogenèse,**
- **l'influence de l'âge et le rôle du statut tabagique sur les effets observés.**

Pour atteindre notre objectif, nous nous sommes intéressés à différents mécanismes potentiellement impliqués dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse que sont la génotoxicité indirecte et des modifications épigénétiques. Le volet concernant la génotoxicité indirecte a été approfondi par une mesure de l'activité télomérase, dont la perturbation peut conduire à une perte de la sénescence répllicative ou à une instabilité chromosomique. Nous nous sommes aussi intéressés aux modifications épigénétiques éventuellement induites par les PM_{2.5}, approche nouvelle en toxicologie environnementale. Sur la base de marqueurs épigénétiques décrits dans les cancers broncho-pulmonaires, nous avons étudié l'état de méthylation globale de l'ADN et la méthylation de promoteurs de gènes tels que *P16^{INK4A}*, gène suppresseur de tumeur intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, et *MGMT*, gène codant pour une enzyme de réparation des dommages à l'ADN, ainsi qu'à leur niveau d'expression génique.

Forts de la connaissance approfondie de nos échantillons, nous avons recherché *in vitro* la capacité des PM_{2.5} à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancérogenèse. Pour ce faire, nous avons choisi plusieurs modèles cellulaires :

- **L'influence de l'âge** a été étudiée sur un modèle de lymphocytes sanguins, prélevés dans trois classes d'âge différentes (Figure 35),

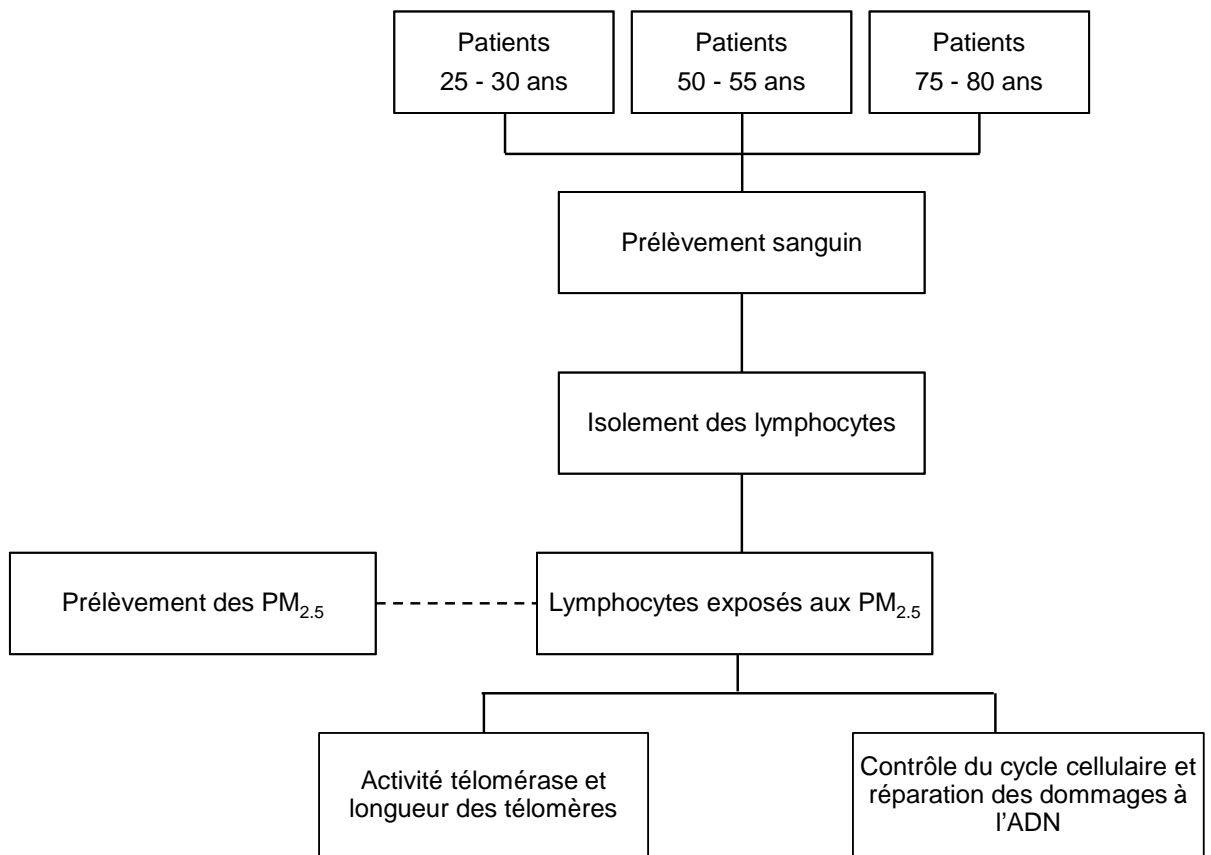


Figure 35 : Protocole expérimental : Recherche de l'influence de l'âge dans la toxicité des PM_{2.5}.

- **Le rôle du statut tabagique** sur la toxicité des particules a pu être étudié grâce à un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires de patients fumeurs ou non-fumeurs avec des cellules épithéliales bronchiques humaines d'origine normale BEAS-2B (Figure 36).

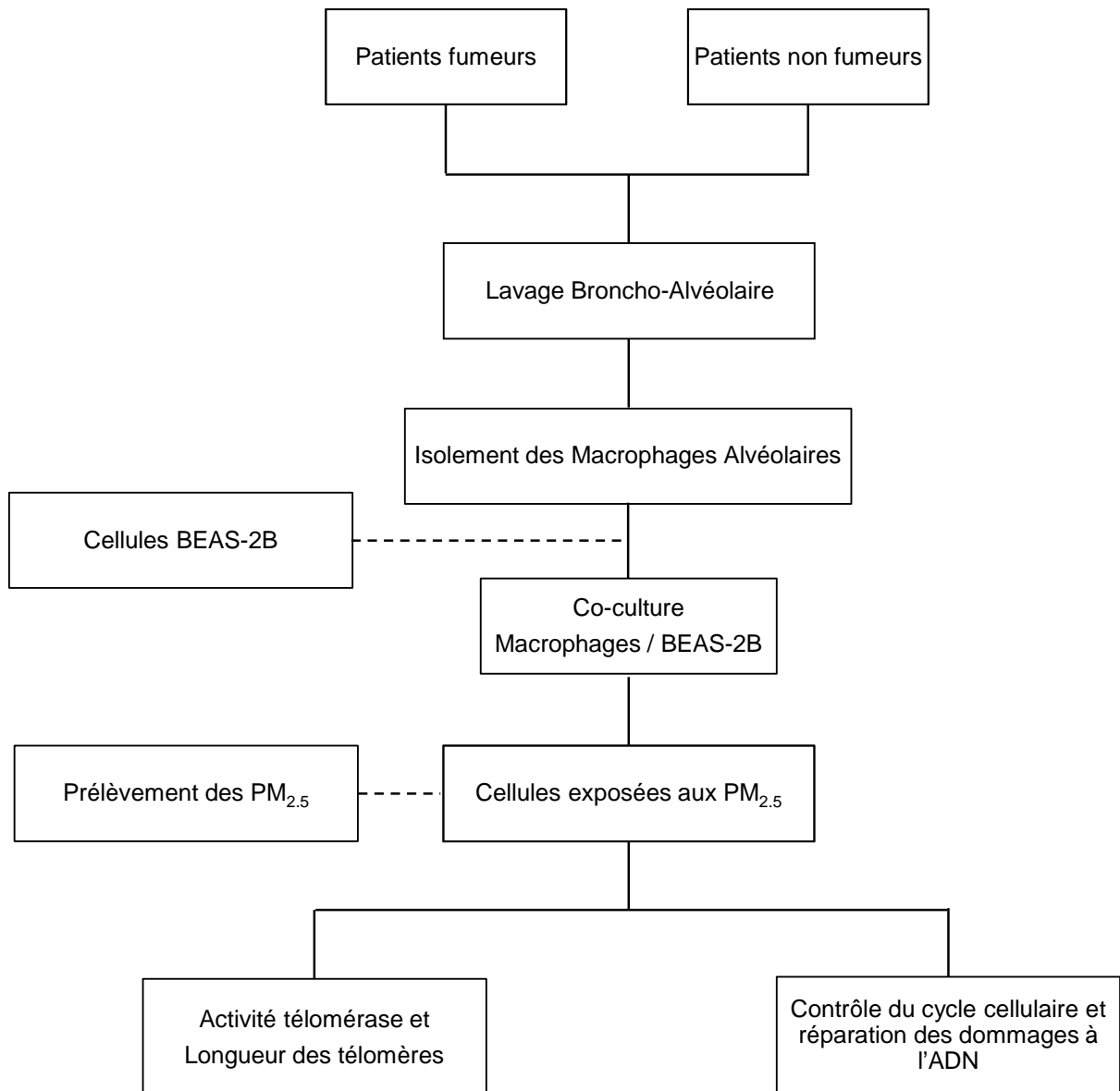


Figure 36 : Protocole expérimental : Recherche de l'influence du statut tabagique dans la toxicité des PM_{2.5}.

La méthodologie employée devrait nous permettre de soulever différentes hypothèses mécanistiques impliquées dans les événements précoces de cancérogénèses et d'associer l'influence de l'âge ou du statut tabagique aux effets observés.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériels chimiques : échantillons de PM_{2.5}

1.1.1. Prélèvements

L'échantillonnage a été réalisé en centre-ville de Dunkerque. Le site choisi est un toit terrasse, situé à une hauteur de 12 m par rapport au niveau du sol (Figure 37).

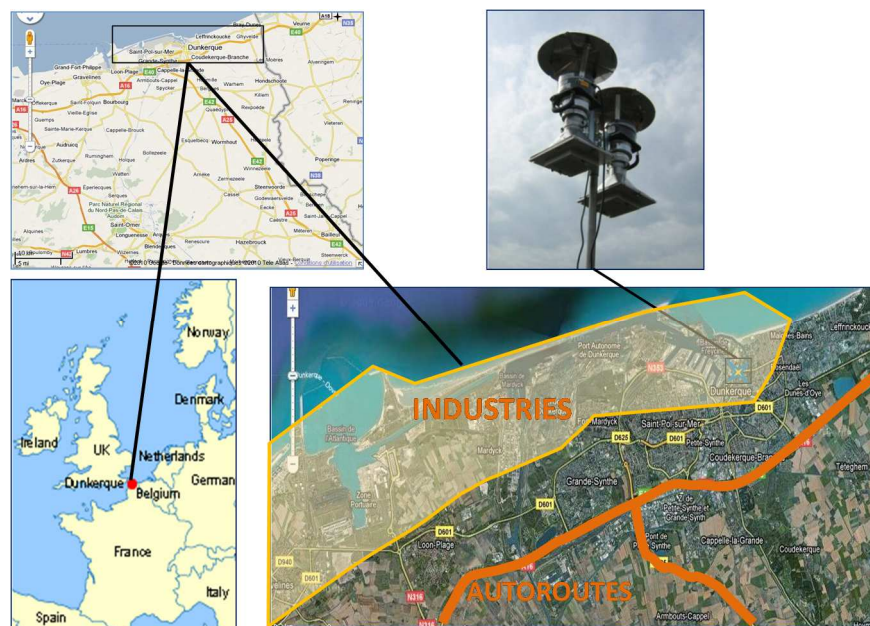


Figure 37 : Localisation des sites de prélèvement (Carte GoogleMaps).

Après une préparation de la campagne d'échantillonnage au cours du mois de février 2011, les prélèvements ont été effectués du 10/03/2011 au 22/07/2011 à l'aide d'impacteurs en cascade (Staplex modèle Sierra 235) (Figure 38).



Figure 38 : Systèmes de prélèvement de particules en suspension dans l'air.

Le système de prélèvement par impaction en cascade a été dupliqué afin d'augmenter la masse de particules collectées. Chaque impacteur était connecté à sa propre pompe haut volume afin de limiter les pertes de charge. Les pompes étaient asservies à la météo via un système électronique de contrôle : les prélèvements étaient réalisés en prenant en compte toutes les directions de vent et une coupure automatique du prélèvement était activée lors des épisodes de pluie. Le système de contrôle utilisé permettait, de plus, d'enregistrer les données météorologiques associées aux périodes de prélèvement (direction et vitesse de vent, pluviométrie, température, humidité), ainsi que les durées de fonctionnement de chaque pompe. Une mesure du débit de chaque pompe était effectuée périodiquement au cours des prélèvements afin de s'assurer que les débits permettaient d'assurer une bonne efficacité de l'impaction (débit toujours supérieurs à 80 m³/h).

Chaque impacteur était équipé de la façon suivante :

- Un pré-filtre en acétate de cellulose sur le premier étage afin de retenir les particules de plus grande taille et d'empêcher leur éventuel rebond vers les étages inférieurs ;
- Un filtre back-up en fibre de verre entre le cinquième étage et la plaque support afin de collecter les particules inférieures à 0,33 µm. Ces particules n'ont pas été intégrées dans l'étude toxicologique.

Les échantillons prélevés sur les impacteurs (PM_{0.33-2.5}) étaient collectés tous les 10 à 15 jours.

1.1.2. Caractérisation physico-chimique des PM_{2.5}

La caractérisation physico-chimique des PM_{2.5} a été étudiée par le Centre Commun de Mesures de l'ULCO, dirigée par le Dr Fabrice CAZIER, selon différentes techniques reprises dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Paramètres mesurés et techniques utilisées pour la caractérisation des PM_{2.5}.

Paramètre mesuré	Technique
Distribution granulométrique	Microscopie électronique à balayage
Surface spécifique	Porosimétrie à l'azote
Compositions en ions	Chromatographie ionique
Composition en métaux et métalloïdes	Spectroscopie atomique à l'aide d'un plasma inductif couplé à un spectromètre de masse (ICP/MS)
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) après extraction au Soxhlet des composés lourds
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Chlorés	Chromatographie en phase gazeuse haute résolution couplée à un spectromètre de masse haute résolution (HR/GC-HR/MS), après extraction sous pression et purification par chromatographie liquide

Les principales caractéristiques physico-chimiques des échantillons de PM_{2.5} sont reprises dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de PM_{2,5}.

Prélèvement	Impacteur en cascade
Durée (h)	2611
Débit (m ³ / h)	80
Masse de PM _{2,5} collectée (mg)	3060
Concentration moyenne estimée en PM _{2,5} (µg / m ³)	9,11

Métaux majoritaires (µg / g)	
Aluminium	14818
Baryum	213
Calcium	44513
Chrome	89
Cuivre	322
Fer	30513
Potassium	3929
Magnésium	8986
Manganèse	3503
Sodium	30457
Nickel	73
Plomb	144
Strontium	94
Titane	412
Vanadium	64
Zinc	1602
<i>Total métaux</i>	<i>139732</i>

Concentration des ions (mg / g)	
Chlorure	62,12
Nitrate	180,07
Sulfate	32,25
Ammonium	14,22
Calcium	47,06
Magnésium	7,85
Potassium	2,58
Sodium	48,46
<i>Total</i>	<i>394,62</i>

Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) (µg / g)	
Naphtalène	0,53
Acénaphthylène	< LD
Acénaphthène	< LD
Fluorène	0,14
Phénanthrène	2,38
Anthracène	1,51
Fluoranthène	2,52
Pyrène	2,22
Benzo(a)anthracène	3,25
Chrysène	5,03
Benzo(b)fluoranthène	9,55
Benzo(k)fluoranthène	5,28
Benzo(a)pyrène	3,16
Indeno(123cd)pyrène	5,27
Dibenzo(ah)anthracène	2,01
Benzo(ghi)pérylène	5,22
<i>Total HAP</i>	<i>47,52</i>

Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Chlorés	ng/g	I-TEQ OTAN
Dioxines (PCDD)	1,675	0,006 - 0,085
Furanes (PCDF)	0,499	0,008 - 0,040
Polychlorobiphényles type dioxine (DL-PCB)	11,057	0,001 - 0,057

Pourcentage d'éléments / masse des particules	
Azote	4,67
Carbone	11,27
Hydrogène	2,10
Soufre	0,55
Oxygène	22,47

< LD : inférieur à la limite de détection

1.1.3. Préparation des PM_{2.5} pour les études toxicologiques

Les particules ont été remises en suspension dans le milieu de culture complet à une concentration mère. Afin d'éviter la formation d'agrégats, les suspensions de particules ont été soumises aux ultrasons pendant 5 min immédiatement avant dilution aux concentrations finales d'exposition des cellules.

1.2. Matériels biologiques

1.2.1. Cellules BEAS-2B

Dans notre étude, nous avons cultivé des cellules BEAS-2B (ATCC® CRL-9609®), initialement décrites par Reddel *et al.* (Reddel et al., 1988).

Cette lignée humaine est issue d'un épithélium bronchique normal prélevé au cours de l'autopsie d'un individu non-cancéreux. Ces cellules épithéliales ont ensuite été infectées par un hybride adénovirus 12 - virus SV40 puis clonées. Ces cellules requièrent des surfaces de culture préalablement traitées afin d'optimiser leur adhésion. Elles nécessitent également l'utilisation d'un milieu de culture défini, afin d'éviter une différenciation squameuse en réponse au sérum. Il convient également de les cultiver à une densité inférieure à 80 % de confluence, afin de prévenir leur dé-différenciation.

Les cellules BEAS-2B ne présentent pas de mutations du gène *TP53* et ne sont pas tumorigènes chez la souris *nude*. Des études cytogénétiques ont également mis en évidence l'absence d'anomalies majeures jusqu'au 12^{ème} repiquage et l'apparition d'anomalies caractéristiques à partir du 21^{ème} passage (Ohnuki et al., 1996).

1.2.2. Macrophages alvéolaires

1.2.2.1. Procédures d'inclusion

Les macrophages alvéolaires ont été obtenus par Lavage broncho-alvéolaire (LBA), après accord du Comité pour la Protection des Personnes (accord du CPP le 20/12/2011, ECH 11/03).

Dans le recueil des macrophages alvéolaires, le statut tabagique devait être précisé au contraire de l'âge du patient qui ne l'était pas pour ce modèle.

Critères d'inclusion :

- Patient âgé de plus de 18 ans
- Patient ayant accepté l'étude après consentement éclairé (Annexe 1)
- Patient fumeur, non-fumeur ou ancien fumeur depuis plus de 10 ans patient à jeun depuis 4 heures

Critères d'exclusion :

- Patient d'âge < 18 ans
- Patient refusant l'étude après consentement éclairé
- Patients traités par corticoïdes, immunosuppresseurs, radiothérapie, chimiothérapie
- Patient exerçant certaines activités professionnelles (ouvrier dans la métallurgie, dans la pétrochimie ou peintre)
- Patient sous tutelle ou curatelle
- Grossesse évolutive
- Bradycardie < 40 pulsations / min, tachycardie > 120 pulsations / min, saturation au doigt en air ambiant < 92 % avant fibroscopie bronchique
- Patient intubé-ventilé
- Etat de détresse respiratoire aiguë
- Insuffisance respiratoire chronique oxygéno-dépendante

- Cancer bronchique ou découverte d'une pathologie néoplasique pendant l'examen endobronchique
- Pneumopathie infectieuse en cours ou découverte pendant l'examen endobronchique
- Allergie à la xylocaïne utilisée pour l'anesthésie des voies aériennes
- Patient non à jeun

1.2.2.2. Lavage broncho-alvéolaire

Réalisé au cours d'une fibroscopie bronchique, le lavage broncho-alvéolaire permet le recueil des cellules libres présentes dans les espaces aériens périphériques ainsi que des milieux biologiques qui tapissent le tractus respiratoire.

1.2.2.3. Aspects techniques du LBA

La technique du LBA consiste à injecter dans un segment pulmonaire 100 à 300 mL (Kleeh and Pohl, 1989) de sérum physiologique stérile, puis à le réaspirer.

Le LBA est effectué au cours d'une endoscopie bronchique avec un fibroscope souple. La fibroscopie bronchique est un examen qui permet d'étudier l'arbre bronchique à l'aide d'un fibroscope optique introduit par voie nasale, orale ou lors d'une intubation chez un patient (Drent et al., 2001). Elle permet d'inspecter les bronches (jusqu'aux quatrièmes parfois cinquièmes divisions) et de faire des prélèvements. L'anesthésie locale de la sphère ORL est réalisée d'abord à l'aide d'une nébulisation de xylocaïne. Elle est complétée par application locale de la xylocaïne à 2 % en aérosol spray du nez et / ou de la gorge puis par instillation dans la trachée et les bronches segmentaires. Enfin, l'anesthésie de l'orifice bronchique dans lequel sera effectué le LBA, a pour but d'éviter la toux pendant l'examen. Cette toux pourrait entraîner des microtraumatismes avec saignement et perte d'une partie du liquide injecté. La xylocaïne altère certaines activités fonctionnelles des cellules mais ne modifie pas l'analyse cytologique du LBA (Kleeh and Pohl, 1989).

1.2.2.4. Injection et la récupération du sérum physiologique

On peut effectuer le LBA à n'importe quel endroit mais par commodité, c'est la lingula ou le lobe moyen qui sont le plus souvent choisis, car le rendement y est meilleur : le fibroscope pouvant y être positionné facilement et l'opérateur trouver une position stable (Wallaert et al., 1992).

Le sérum physiologique stérile utilisé est maintenu à température ambiante pour une meilleure tolérance et une meilleure récupération du liquide. Le liquide est injecté par le canal à biopsie (Drent et al., 2001). Le volume injecté varie entre 100 et 300 mL, introduit par fractions de 60 mL injectées avec une seringue. Il est préférable de réaliser un LBA avec un volume injecté important (de 250 à 300 mL) afin de permettre une étude optimale. Le recueil s'effectue par l'intermédiaire d'un piège à sécrétions (20 ou 50 mL) sur des tubes plastique siliconés, car l'adhérence spontanée des macrophages alvéolaires au verre entraîne une diminution nette de leur nombre relatif et augmente d'autant le pourcentage des autres types cellulaires. L'aspiration douce (-50cm H₂O) est suffisante pour assurer la récupération du liquide injecté, le mieux étant de réaspirer manuellement pour éviter au maximum le collapsus de la bronche étudiée. Le pourcentage de liquide récupéré, par rapport au volume injecté varie de 50 à 75 %. Le liquide réaspiré dans la première seringue est recueilli séparément. Ce prélèvement initial ramène en effet des cellules et des milieux biologiques provenant des bronches et des bronchioles périphériques. Les aliquots suivants sont plus représentatifs de l'étage alvéolaire et peuvent être mélangés lors du recueil. Ils correspondent véritablement au LBA. Cependant, les résultats cellulaires du premier tube sont indispensables pour interpréter correctement les résultats fournis par le LBA. Il est également important d'indiquer le volume recueilli par rapport au volume injecté (Klech and Pohl, 1989). En effet, en fonction du volume recueilli, on peut apprécier la qualité du LBA et son caractère interprétable ou non.

1.2.2.5. Analyse cytologique

La numération cellulaire globale est effectuée de façon manuelle ou automatisée. Les résultats de l'analyse cytologique du LBA doivent être présentés de façon standardisée

et faire apparaître les caractéristiques du tube 1 et du LBA proprement dit. La présence de cellules bronchiques et / ou d'hématies est importante à prendre en considération pour l'interprétation définitive du résultat. Les premières témoignent d'une contamination bronchique et les secondes d'une éventuelle contamination par le sang. On estime que si le pourcentage de cellules ciliées et / ou épithéliales squameuses dépasse 5 %, le LBA n'a pas été réalisé de façon satisfaisante (Klech and Pohl, 1989). Wallaert et al. (1992) ont défini, dans le Tableau 12, le pourcentage correct de chaque population cellulaire dans un LBA.

Tableau 12 : Constituants cellulaires du LBA chez un sujet sain non-fumeur.

Paramètre mesuré	Étalement sur lame (%)	Cytocentrifugation (%)
Macrophages (%)	84 +/- 7	93 +/- 7
Lymphocytes (%)	15 +/- 3	7 +/- 1
Neutrophiles (%)	< 1 à 2	< 1 à 2

1.2.2.6. Effets secondaires

Le LBA est un examen sûr, peu invasif et généralement bien toléré ; cependant, il existe un certain nombre d'effets secondaires possibles à connaître (Drent et al., 2001) et qui sont résumés dans le Tableau 13 :

Tableau 13 : Effets secondaires possibles du lavage broncho-alvéolaire. LBA : *Lavage Broncho-Alvéolaire*.

Hyperthermie	Dans 10 à 30 % des cas, dans les heures qui suivent le LBA
Réponse inflammatoire	Augmentation de l'afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau du tractus respiratoire inférieur dans les 72 h suivantes
Bronchospasme	Surtout les patients asthmatiques ou présentant une hyperréactivité bronchique
Décompensation respiratoire	Exceptionnelle
Anomalies à la radiographie thoracique	Infiltrats radiologiques dans le territoire du LBA 30 minutes après et régressifs en 24 h
Hémorragie intra-alvéolaire	Rare
Troubles du rythme cardiaque	< 2 % des LBA

1.2.2.7. Récupération des macrophages

1.2.2.7.1. Principe

Les macrophages alvéolaires proviennent des alvéoles pulmonaires et sont recueillies au cours d'une fibroscopie bronchique avec LBA. La première fraction du lavage ré aspirée contient essentiellement du mucus et des cellules bronchiques : elle est le reflet de l'épithélium bronchique proximal. Le reste des prélèvements est le reflet de l'épithélium bronchiolo-alvéolaire contenant un pourcentage élevé de macrophages.

1.2.2.7.2. Protocole

Conformément aux recommandations internationales, nous avons procédé à la réalisation d'une fibroscopie bronchique avec lavage broncho-alvéolaire au sein du service de pneumologie du Centre Hospitalier Saint Philibert à Lille. Nous avons injecté 150 à 300 mL de solution isotonique à température ambiante dans une bronche segmentaire ou mieux sous-segmentaire par cathétérisme bloqué. L'injection s'est faite par fraction de 60 mL immédiatement récupérée. Après ajout d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine ; Life Technologies, Cergy Pontoise, France) et antifongiques (fungizone ; Life Technologies), les deux fractions récupérées ont été conservées à 4°C dans de la glace pilée et acheminées dans un délai de 4h à l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (EA 4492) de l'Université du Littoral-Côte d'Opale.

Par flacon de prélèvement :

- Ajout de 1 % (v/v) de la solution d'Antibiotiques (pénicilline, 100 U/mL ; streptomycine, 100 µg/mL)
- Ajout de 1 % (v/v) de la solution d'Antimycotiques (fungizone, 1µL/mL)

Après centrifugation (10 min, 500g, 4°C) des liquides recueillis par LBA, les culots cellulaires sont lavés (2x 10 mL) avec du milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplémenté à 1 % (v/v) avec un antifongique (fungizone) et à 1 % (v/v) avec des antibiotiques (pénicilline / streptomycine). Des numérations sont faites sur liquide à l'état frais à l'aide du compteur automatique (Cellometer Auto T4 Cell Counter,

Nexcelom Bioscience, Lawrence, US). La formule cellulaire est réalisée après cyto centrifugation et coloration de May-Grünwald-Giemsa.

1.2.3. Co-cultures Macrophages Alvéolaires / Cellules BEAS-2B

Les co-cultures MA / BEAS-2B ont été réalisés grâce à un dispositif de microplaques de culture à 6 puits associés à des inserts dont la surface d'adhésion des cellules, de par sa porosité (0,4 μm), n'autorise que les interactions entre les deux modèles cellulaires via la sécrétion de facteurs diffusibles, et interdit toute migration de l'un ou l'autre de ces modèles cellulaires (Corning ; Fisher Scientific Labosi SAS) (Figure 39).

Les MA et les cellules BEAS-2B ont été cultivés d'abord séparément, respectivement dans les inserts (500×10^3 MA / insert) ou dans les puits des microplaques (1.10^6 cellules BEAS-2B / insert), en présence de RPMI 1640 complet, contenant 10 % (v/v) de SVF.

Les microplaques et les inserts ont été incubées à 37°C, dans une atmosphère enrichie en CO_2 (5 %) et saturée en humidité, et, après 4 h, un changement des milieux de culture a permis d'éliminer les cellules non adhérentes, avant que les inserts ne soient associés aux puits et que les MA et les cellules BEAS-2B puissent interagir.

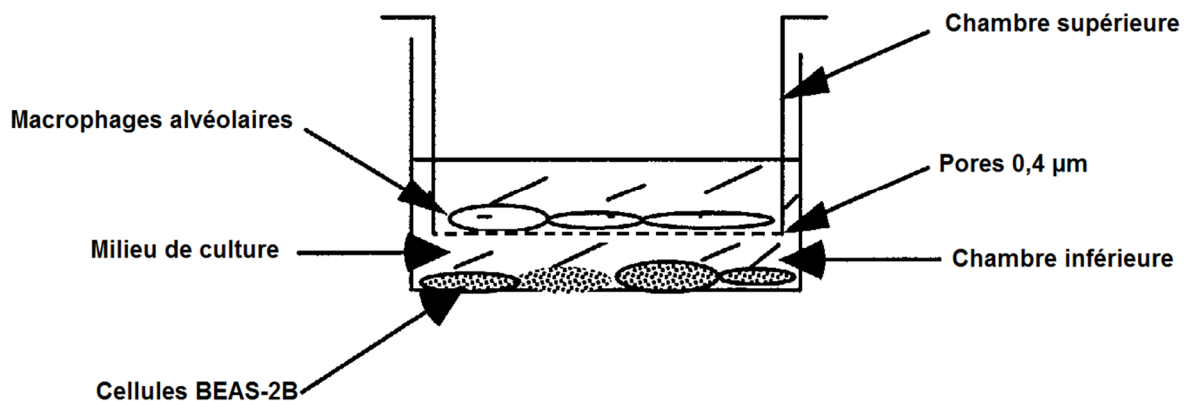


Figure 39 : Modèle de co-culture Macrophages Alvéolaires / cellules BEAS-2B.

1.2.4. Lymphocytes sanguins

1.2.4.1. Procédures d'inclusion

Les lymphocytes sanguins ont été obtenus par prélèvements de sang veineux périphérique, après accord du Comité pour la Protection des Personnes (accord du CPP le 20/12/2011, ECH 11/03).

Dans le recueil des lymphocytes sanguins, l'âge devait être obligatoirement précisé. L'influence du statut tabagique n'était pas étudiée dans ce modèle, tous les patients inclus étaient non-fumeurs.

Critères d'inclusion :

- Patient âgé de plus de 18 ans
- Patient ayant accepté l'étude après consentement éclairé (Annexe 1)
- Patient non-fumeur ou ancien fumeur depuis plus de 10 ans

Critères d'exclusion :

- Patient d'âge < 18 ans
- Patient refusant l'étude après consentement éclairé
- Patients traités par corticoïdes, immunosuppresseurs, radiothérapie, chimiothérapie
- Patient exerçant certaines activités professionnelles (ouvrier dans la métallurgie, dans la pétrochimie ou peintre)
- Patient sous tutelle ou curatelle
- Grossesse évolutive
- Pathologie infectieuse ou néoplasique en cours
- Patient fumeur ou ancien fumeur depuis moins de 10 ans

1.2.4.2. Principe

En pratique, le sang veineux périphérique est prélevé dans des tubes sur anticoagulant sec (EDTA calcique). Lors du prélèvement, le tube doit être agité par

retournements successifs pour éviter la formation de micro-caillots. De plus, pour avoir une analyse cytologique correcte et une numération plaquettaire exacte, l'examen doit être réalisé rapidement (< 2h) après le prélèvement. Le sang peut être conservé jusqu'à 24 h à +4°C sans modification notables de la numération mais la cytologie des cellules peut évoluer. La numération et la formule sanguine sont maintenant réalisées sur des automates.

L'hémogramme constitue l'expression du résultat de la numération des éléments cellulaires du sang circulant (hématies, leucocytes et plaquettes) accompagné de paramètres permettant de caractériser la population érythrocytaire (constantes érythrocytaires) et de la proportion des différents types de leucocytes (polynucléaires [neutrophiles, éosinophiles et basophiles], lymphocytes, monocytes et la détection éventuellement d'autres cellules anormalement rencontrées dans le sang ; l'expression de cette proportion étant désignée par le terme de formule leucocytaire) (Figure 40).

Les valeurs biologiques usuelles pour les lymphocytes sanguins circulants sont comprises entre 1 et $4 \times 10^9 / L$.

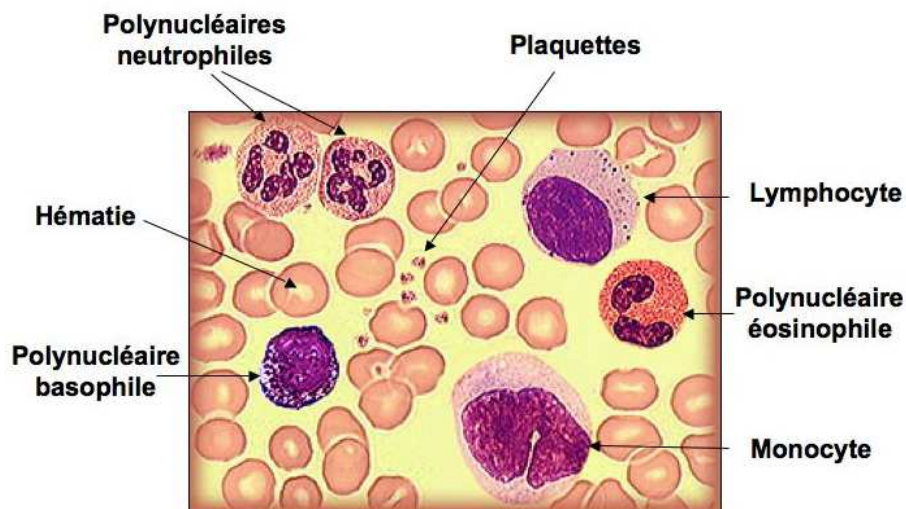


Figure 40 : Représentation des différents éléments cellulaires du sang circulant (SFH, 2010).

1.2.4.3. Protocole de récupération

Ce protocole est adapté de Böyum, 1968 (Böyum, 1968) et manuel *Culture of Animal Cells* (protocole section 27.2) (Ian Freshney, 2011).

- Prélèvement stérilement d'environ 15 mL de sang sur tube EDTA.
- Conservation à température ambiante (15-22°C) et traitement endéans 24 h.
- Récupération des lymphocytes :
 - Regrouper les différents tubes puis répartir 2,5 mL de sang dans des tubes Falcon 15 mL.
 - Ajouter 2,5 mL de PBS-EDTA 1mM (filtré sur filtre 0,22 µm) et homogénéiser.
 - Dans un nouveau tube de 15 mL, déposer délicatement les 5 mL du mélange sang + PBS sur 2,5 mL de Ficoll-Hypaque (filtré sur filtre 0,22 µm).
 - Centrifuger le tube à 400 g pendant 15 minutes (accélération et décélération douce).
 - Eliminer le surnageant sans perturber l'interface.
 - Récupérer l'interface et verser dans un tube de Falcon 15 mL.
 - Compléter QSP 10 mL de milieu de culture complet : milieu RPMI + L-Glutamine 1% + SVF (20%) + Antibiotiques 1% (Pénicilline, 100 U/mL ; Streptomycine, 100 µg/mL).
 - Centrifuger à 400 g pendant 10 minutes.
 - Eliminer le surnageant puis remise en suspension du culot dans 2 mL de milieu RPMI et regroupement des 2 culots dans un tube.
 - Comptage.

2. Méthodes

2.1. Culture et exposition des cellules

2.1.1. Co-culture Macrophages Alvéolaires / Cellules BEAS 2-B

2.1.1.1. Conditions de culture

L'ensemencement des cellules BEAS-2B a été réalisé 24 h avant exposition, dans des plaques de culture 6 puits de type CellBind® (Corning ; Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5 % de CO₂ dans du BEGM, supplémenté de 1 % (v/v) d'amphotéricine B (2,5 µg / mL), afin de limiter les contaminations fongiques.

Après le lavage broncho-alvéolaire les macrophages alvéolaires ont été mis en culture. Les cellules ont été ensemencées dans des inserts à raison de 500 x 10³ MA / 1,5 mL RPMI 1640 (sérum de veau fœtal (SVF) 10 % v/v) par insert. Les boîtes ont ensuite été disposées dans un incubateur (37°C, 5% CO₂ et 100 % humidité). Après 4 h de mise en culture, le milieu a été changé pour éliminer les cellules mortes et les hématies.

2.1.1.2. Exposition

Les cellules ont été exposées en remplaçant le milieu de culture initial par du milieu frais contenant, selon les conditions :

- les échantillons de particules à une concentration de :
 - 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 µg / cm² pour les tests de cytotoxicité,
 - 3 ou 15 µg / cm² pour les autres paramètres étudiés,

Des cellules non-exposées ont été utilisées comme témoin dans chaque expérience.

Le temps d'exposition des cellules aux particules atmosphériques varie entre 24 h et 72 h, et dépend du paramètre toxicologique mesuré.

2.1.1.3. Récupération

A la fin de la période d'exposition, le milieu de culture a été éliminé et les cellules rincées 2 fois au PBS préalablement chauffé à 37°C. Les plaques de culture 6 puits contenant les cellules ont été conservées à -80° après élimination du PBS jusqu'à leur utilisation.

2.1.2. Lymphocytes sanguins

2.1.2.1. Conditions de culture

Les lymphocytes ont été mis en culture dans des tubes Lejeune contenant 5 mL de milieu de culture complet : milieu RPMI + L-Glutamine 1% + SVF (20%) + Antibiotiques (Pénicilline, 100 U/mL ; Streptomycine, 100 µg/mL) + 5 µg/mL de phytohémmagglutinine (E et L) puis incubé à 37°C sous oscillation.

2.1.2.2. Exposition

Les cellules ont été exposées par dilution d'une suspension de PM_{2.5} dans le milieu de culture, afin d'exposer les cellules à une concentration de 45 µg de PM_{2.5} / mL. Des cellules non-exposées ont été utilisées comme témoin dans chaque expérience.

Le temps d'exposition a été fixé à 72 h pour toutes les analyses.

2.1.2.3. Récupération

A la fin de la période d'exposition, le milieu de culture a été centrifugé et les cellules rincées 2 fois au PBS préalablement chauffé à 37°C. Les cellules destinées à la PCR méthylation spécifique ont été centrifugées 5 minutes à 150 g (4°C). Le surnageant a été éliminé et les cellules congelées à -80°C sous la forme de culots secs.

2.2. Paramètres de toxicité

Les analyses toxicologiques menées dans les deux modèles cellulaires sont :

- Activité télomérase
- Longueur des télomères
- Méthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* et *MGMT*
- Expression génique de *P16^{INK4A}* et *MGM*

2.2.1. Activité télomérase

2.2.1.1. Principe

La télomérase est une enzyme dont le rôle est de synthétiser les extrémités télomériques des chromosomes formées par la répétition de l'hexamère (TTAGGG). Une méthode a ainsi été développée afin de quantifier par qPCR le nombre de copies de la séquence télomérique répliquées par les télomérases lors d'une première étape d'incubation. L'étape de détection repose, comme toute qPCR, sur l'utilisation d'amorces et d'une sonde qui fluoresce lorsqu'elle s'intercale entre les brins d'ADN au cours des cycles d'amplification.

2.2.1.2. Protocole

L'activité télomérase a été mesurée dans des cellules BEAS-2B, macrophages et lymphocytes exposés ou non pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm², au B[a]P, ou au TiO₂, en utilisant le kit *TRAPEZE RT Telomerase Detection* (Merck-Millipore) selon les instructions du fabricant.

- Resuspension des culots cellulaires dans du tampon de lyse CHAPS (200 µL / 10⁶ cellules)
- 30 min d'incubation sur la glace
- Centrifugation des tubes à 12 000 g pendant 20 min (4°C)
- Transfert du surnageant dans un nouveau tube
- Elimination du culot contenant les débris cellulaires
- Dosage de la quantité de protéines par méthode BCA.

Les échantillons ont été dilués dans le CHAPS pour obtenir une concentration en protéines d'environ 350 µg / mL, puis déposés sur la plaque à raison de 2 µL par puits. En plus des échantillons, différents contrôles ont été ajoutés sur chaque plaque :

- deux contrôles négatifs « réactifs » (CHAPS et eau *PCR-grade*)
- un contrôle « cellules télomérase positives » fourni dans le kit
- des contrôles négatifs d'échantillons inactivés à la chaleur (30 min à 85°C)

- une gamme de standard *TSR 8*, pour lequel le nombre de copies de la séquence télomérique est connu (4 points, séparés d'un facteur 10).

L'absence d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons a été vérifiée avant le début de la manipulation, grâce à une gamme *TSK* comparée au mélange échantillon/*TSK*.

La plaque a été réalisée en mélangeant 2 μL d'échantillon dilué, de contrôle ou de standard aux réactifs suivants :

- 5 μL de *Reaction Mix 5X*
- 0,5 μL de Taq polymérase
- 17,5 μL d'eau *PCR-grade*

L'étape de synthèse des hexamères par les télomérases et de PCR a ensuite été réalisée à l'aide d'un thermocycleur ABI 7500 Fast (Applied Biosystem®) selon le protocole suivant :

- 30 min à 30°C (élongation par les télomérases)
- 2 min à 95°C (activation de la Taq polymérase)
- 45 cycles d'amplification :
 - 15 s à 94°C (dénaturation)
 - 1 min à 59°C (hybridation-élongation)
 - 10 s à 45°C (collecte des données)

2.2.1.3. Analyse

Pour déterminer la positivité d'une PCR et/ou quantifier un échantillon par PCR en temps réel, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Le moment d'apparition du signal, dénommé cycle seuil ou Ct (Cycle threshold), est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le Ct calculé est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. Il apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR. Les valeurs de Ct ont été obtenues pour chaque point grâce au logiciel *Sequence*

Detection Software v.2.0.3. Pour chaque plaque, la droite de calibration a été calculée à partir de la gamme de standard TSR8 selon la relation :

$$Ct = f(\log(\text{nombre de copies})).$$

L'équation de la régression linéaire obtenue pour cette gamme a ensuite été utilisée pour déterminer le nombre de copies dans chaque condition à partir de la valeur de Ct obtenue. Les résultats ont été normalisés par rapport au facteur de dilution et à la quantité de protéines, puis exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de trente réplicats biologiques par classe d'âge pour les lymphocytes et treize réplicats non-fumeurs, treize fumeurs pour les co-cultures MA / Cellules BEAS-2B.

2.2.2. Longueur des télomères

2.2.2.1. Principe

La mesure de la longueur des télomères peut être réalisée sur tout type de support biologique (tissus, cellules circulantes, progéniteurs et cellules souches). Cependant, pour des raisons éthiques ou techniques, certains supports ne sont que peu (ou pas) utilisés en pratique courante. Dans la majorité des études cliniques actuelles, la mesure de la longueur des télomères est estimée par la détermination de la longueur des télomères leucocytaires (LTL). Ce type de mesure ne reflète pas forcément la « dynamique » des télomères de tous les tissus. Cependant, même si la longueur des télomères des différents types cellulaires n'est pas équivalente, la cinétique de raccourcissement est équivalente (Takubo et al., 2002).

La mesure de la longueur des télomères par qPCR a été proposée en 2002 par Cawthon puis réactualisée en 2009 (Cawthon, 2002, 2009). Elle fournit une mesure précise du nombre de répétitions coiffant les chromosomes. Elle consiste en la détermination par qPCR du nombre de copies du motif télomérique (T) par rapport à un gène simple copie (S) sous la forme d'un ratio (T/S).

2.2.2.2. Protocole

A partir de culots secs de macrophages et de lymphocytes (10^6 cellules), l'ADN a été extrait (Blood & Cell Culture DNA Mini Kit, QIAGEN®) et dosé par microspectrophotométrie (μ droplante, thermo scientific). L'évaluation de la taille des télomères a été réalisée sur un thermocycleur ABI 7500 Fast (Applied Biosystem®) par une technique de PCR en temps réel.

Le mélange réactionnel d'un volume final de 20 μ L est composé de 5 μ L de solution d'ADN à 5 ng/ μ L, 1 μ L d'amorce sens, 1 μ L d'amorce anti-sens, 10 μ L de 2X Power SYBR® Green master mix (Applied Biosystem®) et 3 μ L d'eau N-free. Les amorces pour les télomères et le gène de référence 36B4 ont été ajoutées à une concentration finale de 0,2 μ M et 0,3 μ M, respectivement (Tableau 14).

Tableau 14 : Séquence nucléotidique des amorces sens et anti-sens des télomères et du gène 36B4.

	Amorce sens	Amorce anti-sens
Télomère	5'-CGGTTTGGTTGGTTGGG TTTGGGTTTGGGTTGGGTT-3'	5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCT TACCCTTACCCTTACCCT-3'
36B4	5'-CAGCAAGTGGGAA GGTGTAATCC-3'	5'-CCCATTCTATCATC AACGGGTACAA-3'

Le gène de référence utilisé est le gène simple copie de la 36B4 (acidic ribosomal phosphoproteins P0) qui a été utilisé comme contrôle pour l'amplification de chaque échantillon réalisé, tel qu'a décrit Cawthon (Cawthon, 2002, 2009). Les conditions de la réaction PCR sont décrites dans le Tableau 15 (Cawthon, 2002, 2009).

Tableau 15 : Conditions d'amplifications des télomères et du gène 36B4.

	Dénaturation	Cycles			Température de transition de l'hybridation	
		Nombre	Dénaturation	Hybridation		Elongation
Télomère	95°C, 10 minutes	20	95°C, 5 secondes	56°C, 10 secondes	72°C, 40 secondes	4°C / seconde
36B4	95°C, 10 minutes	30	95°C, 5 secondes	58°C, 10 secondes	72°C, 40 secondes	4°C / seconde

2.2.2.3. Analyse

La longueur des télomères est évalué par la technique des $\Delta\Delta C_t$ en selon l'équation suivante :

$$\text{Ratio} = 2^{-[(Ct_{\text{télomère}} - Ct_{36B4})_{\text{Exposé}} - (Ct_{\text{télomère}} - Ct_{36B4})_{\text{Témoin}}]}$$

2.2.3. Méthylation spécifique des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT*

2.2.3.1. Principe

La conversion au bisulfite d'un échantillon d'ADN transforme les cytosines non-méthylées en uraciles, alors que les cytosines méthylées sont protégées par le groupement méthyle (Figure 41). La séquence en est ainsi modifiée et il devient possible, en utilisant des amorces spécifiques de la séquence contenant les U ou de celle contenant les C, de discriminer les formes méthylées des formes non-méthylées.

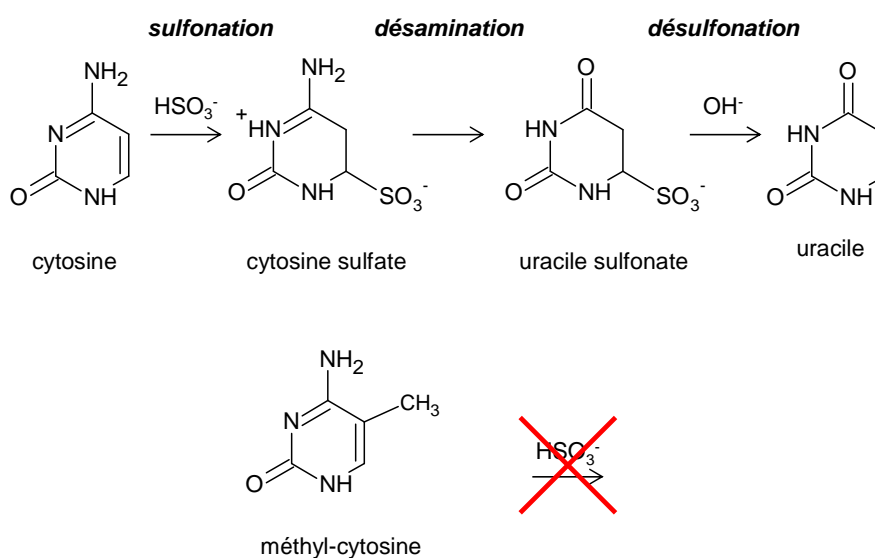


Figure 41 : Réaction de conversion au bisulfite des cytosines en fonction de leur niveau de méthylation.

2.2.3.2. Protocole

L'évaluation de la méthylation des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT* a été réalisée

- dans les lymphocytes exposés ou non pendant 72 h aux échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g/mL}$,
- dans les cellules BEAS-2B et les macrophages alvéolaires exposés ou non pendant 24 h aux échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ à des concentrations de $3 \mu\text{g/cm}^2$ ou $15 \mu\text{g/cm}^2$,
- en adaptant le protocole initialement décrit (Herman et al., 1996).
- Extraction de l'ADNg des cellules (500×10^3 cellules / échantillon) sur colonne en utilisant le kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Courtabœuf, France), selon le protocole du fournisseur

- Remise en suspension des culots cellulaires dans 200 µL de PBS, auxquels ont été ajoutés 20 µL de protéinase K ainsi que 200 µL de tampon *AL*
- Incubation pendant 10 min d'incubation à 56°C
- Ajout de 200 µL d'éthanol absolu à la suspension afin de précipiter les acides nucléiques
- Transfert de la suspension sur la colonne
- Centrifugation de la colonne à 6 000 g pendant 1 min, afin d'éliminer le liquide tout en conservant l'ADN fixé à la membrane de silice
- Lavage de l'ADN grâce à 500 µL des tampons *AW1* puis *AW2*, éliminés par centrifugation (6 000 g, 1 min ; puis 20 000 g, 3 min)
- Elution de l'ADN dans 200 µL de tampon *AE* par centrifugation (6 000 g, 1 min), après 1 min d'incubation permettant sa remise en suspension

L'ADN précédemment extrait a été converti au bisulfite en utilisant le kit *Cell-to-CpG™* (Life Technologies).

L'ADN a tout d'abord été dénaturé :

- Mélange de 45 µL de solution d'ADN à 5 µL de *Denaturation Reagent*,
- Incubation de cette suspension pendant 10 min à 50°C.

La conversion a ensuite été obtenue :

- Transfert de la suspension dans une microplaque 96 puits,
- Ajout de 100 µL de *Conversion Reagent* à chaque échantillon
- Protocole de température à l'aide d'un thermocycleur *7500 Fast* :
 - (30 min à 65°C / 90 s à 95°C) x 2
 - 30 min à 65°C
 - maintien à 4°C.

Les échantillons ainsi traités au bisulfite ont été purifiés sur colonne, selon le protocole suivant :

- Ajout de 600 µl de *Binding Buffer* dans la colonne

- Ajout de l'échantillon converti
- Centrifugation 10 000 g, 1 min
- Lavage par 600 µl de *Wash Buffer*
- Centrifugation 10 000 g, 1 min
- Désulfonation par ajout de 200 µl de *Desulfonation Reagent* et incubation 15 min à température ambiante
- Centrifugation 10 000 g, 1 min
- Lavage par 400 µl de *Wash Buffer*
- Centrifugation 10 000 g, 1min x 2
- Elution par 40 µl d'*Elution Buffer* et incubation 2 min à température ambiante
- Centrifugation 10 000 g, 1 min.

La concentration en ADNg dans les solutions ainsi obtenues a été mesurée par spectrophotométrie UV, grâce à la plaque *µDrop* du lecteur Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). Au vu des concentrations, les solutions ont été diluées au 1/5^{ème} dans de l'eau ultra-pure avant de procéder à la PCR-méthylation spécifique (MSP). Deux µL d'ADN dilué ont été ajoutés à 18 µL du mélange réactionnel suivant :

- 10 µL de *Power SybR Green 2X*
- 2 µL de la solution d'amorces spécifiques de la cible
- 6 µL d'eau ultra-pure.

Le protocole de PCR a été adapté en fonction de la cible (Tableau 16). Etant donné l'importance du signal non-spécifique lors des PCR spécifiques de la forme méthylée, le protocole a été adapté afin de mesurer le signal à une température supérieure à celle d'hybridation-élongation, déterminée en fonction du T_m mesuré lors d'une expérience préalable. Une courbe de fusion a systématiquement été réalisée.

Tableau 16 : Amorces et conditions de PCR utilisées (Herman et al., 1996; Di Vinci et al., 2006).

M : Méthylé ; *UnM* : Non-méthylé ; *S* : Sens ; *AS* : anti-sens.

Cible	Séquences Sens / AntiSens	T° hybridation	Ref. séquence
<i>P16^{INK4A}_M</i>	S: TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC AS: GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	68°C	<i>Herman et al., 1996, DiVinci et al., 2006</i>
<i>P16^{INK4A}_UnM</i>	S: TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT AS: CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A	65°C	<i>Herman et al., 1996, DiVinci et al., 2006</i>
<i>MGMT_M</i>	S: TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC AS: GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G	60°C	<i>DiVinci et al., 2006</i>
<i>MGMT_UnM</i>	S: TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT AS: AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A	62°C	<i>DiVinci et al., 2006</i>

2.2.3.3. Analyse

La spécificité du signal a été vérifiée grâce aux courbes de fusion. Les valeurs de Ct ont été obtenues pour chaque point grâce au logiciel *Sequence Detection Software* v.2.0.3. Le facteur d'expression relative (RQ) a été calculé pour chaque gène et pour chaque temps d'exposition par rapport aux cellules non-exposées selon la formule :

$$\Delta Ct_{\text{cible}} = Ct_{\text{forme_méthylée}} - Ct_{\text{forme_non-méthylée}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ avec } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposition}} - \Delta Ct_{\text{cellules_non-exposées}}$$

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de trente réplicats par classe d'âge pour les lymphocytes et treize réplicats non-fumeurs, treize fumeurs pour les co-cultures MA / Cellules BEAS-2B.

2.2.4. Expression génique de *P16^{INK4A}* et *MGMT*

2.2.4.1. Principe

L'une des propriétés de toutes les ADN polymérases est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce oligonucléotidique. Cette propriété est mise à profit dans la méthode de qPCR en temps réel à l'aide de sondes fluorogéniques TaqMan spécifiques au gène d'intérêt.

2.2.4.2. Protocole

Les amorces oligonucléotidiques synthétiques, capables de s'hybrider aux bornes de la séquence cible, c'est-à-dire de *P16^{INK4A}* et *MGMT* (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems) dont les codes sont respectivement Hs00923894_m1 et Hs01037698_m1 sont utilisées pour réaliser les réplifications qui assureront la multiplication spécifique de la séquence encadrée par ces amorces. L'ARN ribosomique 18s, dont le code TaqMan® Gene Expression Assays est le suivant Hs99999901_s1, est utilisé pour normaliser les résultats.

Les réactions d'amplification ont été réalisées selon le protocole du kit TaqMan® Gene Expression Cells-to-Ct avec pour chaque réaction un mélange de 15 µL de Mix (10 µL de TaqMan Gene expression Master Mix (2x), 1 µL de TaqMan Gene expression Assay (20x), 4 µL de Nuclease free water) et 5 µL d'ADNc.

Le protocole d'amplification comprend :

- une étape d'activation de l'enzyme de 2 minutes à 50°C,
- une étape de dénaturation de 10 minutes à 95°C,
- suivie de 40 cycles constitués :
 - d'une phase de dénaturation de 15 secondes à 95°C,
 - d'une phase d'hybridation des amorces et d'élongation de 1 minute à 60°C.

2.2.4.3. Analyse

L'abondance de l'ARNm étudié dans l'échantillon traité par rapport au témoin a été calculée selon la méthode du delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001). L'expression du gène codant pour l'ARN ribosomique 18S a été utilisée pour normaliser les résultats.

Pour chaque échantillon, il faut rapporter la valeur Ct cible à l'ARNr 18S, cela correspond à la normalisation par rapport à la quantité de départ :

$$\Delta Ct_{\text{cible}} = C_{t \text{ cible}} - C_{t \text{ 18s}}$$
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ avec } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposition}} - \Delta Ct_{\text{cellules_non-exposées}}$$

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de trente réplicats biologiques par classe d'âge et deux réplicats techniques pour les lymphocytes et treize réplicats biologiques pour les non-fumeurs, treize pour les fumeurs et deux réplicats techniques au niveau des co-cultures MA / Cellules BEAS-2B.

2.2.5. Analyses statistiques

2.2.5.1. Logiciels utilisés

Le logiciel Microsoft Excel 2007 a été utilisé pour :

- les calculs de médianes et quartiles
- les calculs de RQ
- les représentations graphiques.

Le logiciel SPSS version 18 (IBM, Bois-Colombes, France) a été utilisé pour :

- les tests de normalité
- les analyses de la variance (ANOVA)
- les corrélations de Spearman

Le logiciel SAS 9.2 (SAS Institute, USA) a été utilisé pour :

- les tests U de Mann-Whitney

2.2.5.2. Statistiques descriptives

La plupart des expériences ayant été réalisées sur un faible nombre de réplicats, l'utilisation des valeurs de moyennes et écart-types était inappropriée. Les analyses descriptives ont donc été réalisées grâce aux paramètres de médiane et quartiles, adaptés aux petits effectifs.

Seules les numérations formules sanguines ont pu être décrites grâce aux moyennes et écart-types, après avoir démontré par des tests de normalité que leur distribution suivait une loi normale.

2.2.5.3. Comparaisons

Considérant la petite taille des effectifs, la plupart des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant des tests non-paramétriques U de Mann-Whitney.

Nous avons également calculé le coefficient de rang de Galton-Spearman (ρ) afin de vérifier l'existence de liens entre deux variables quantitatives mesurées sur une même chronique, à partir de nos échantillons. Les effectifs faibles ne permettent pas d'utiliser le coefficient de Bravais-Pearson. Ce test a été utilisé pour rechercher le lien entre méthylation des promoteurs et expression génique et le lien entre activité télomérase et longueur des télomères.

RESULTATS

1. Notation des échantillons

Afin de faciliter la lecture, la notation des échantillons est identique pour tous les paramètres étudiés.

Cette notation est résumée dans les Tableaux 17 et 18.

Tableau 17 : Notation des échantillons pour le modèle des lymphocytes exposés aux PM_{2.5}.

	Non-exposés	Exposés
25-30 ans		
50-55 ans		
75-80 ans		

Tableau 18 : Notation des échantillons pour le modèle des co-cultures Cellules BEAS-2B / Macrophages Alvéolaires exposés aux PM_{2.5}.

	Non-fumeurs			Fumeurs		
	Témoins	3 µg / cm ²	15 µg / cm ²	Témoins	3 µg / cm ²	15 µg / cm ²
Cellules BEAS-2B						
Macrophages Alvéolaires						

2. Influence de l'âge dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse : Modèle des lymphocytes exposés aux PM_{2.5}

2.1. Caractéristiques des numérations formules sanguines

La numération formule sanguine (NFS) ou hémogramme est composé de la numération globulaire qui dénombre les éléments figurés du sang, du dosage de l'hémoglobine, de la mesure de l'hématocrite, de la formule sanguine (numération de toutes les lignées de globules blancs) ainsi que de la numération plaquettaire. Ce type d'analyse est codifié dans la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM), sous l'expression « *hémogramme y compris plaquettes (NFS, NFP)* » pour lequel NFP signifie Numération Formule Plaquettes.

Les valeurs normales d'une NFS sont décrites dans le Tableau 19 :

Tableau 19 : Valeurs normales d'une Numération Formule Sanguine chez l'Homme (HAS, 1997).

	Valeurs normales
Globules rouges (10¹²/L)	4,0 - 5,2 Femme 4,5 - 5,8 Homme
Hémoglobine (g/dL)	12 - 16 Femme 13 - 18 Homme
Plaquettes (10⁹/L)	150 - 400
Leucocytes (10⁹/L)	4 - 10
Polynucléaires Neutrophiles (10⁹/L)	1,5 - 7
Polynucléaires Eosinophiles (10⁹/L)	0,05 - 0,5
Polynucléaires Basophiles (10⁹/L)	0,01 - 0,05
Lymphocytes (10⁹/L)	1,5 - 4
Monocytes (10⁹/L)	0,1 - 1

Nous n'observons pas de différences dans les NFS des patients issus des trois classes d'âge hormis pour le nombre de globules rouges, le taux d'hémoglobine et le nombre de lymphocytes (Tableau 20). Le nombre de globules rouges décroît significativement en fonction de l'âge (25-30 ans : 4,76*10¹²/L, 50-55 ans : 4,48*10¹²/L,

75-80 ans : $4,14 \cdot 10^{12}/L$). Cependant, les valeurs restent dans les normes quel que soit l'âge. Pour le taux d'hémoglobine, une diminution significative est observée chez les 75-80 ans (12,30 g/dL vs 13,56 et 13,27 g/dL chez les jeunes et les intermédiaires). Bien qu'il diminue chez les plus âgés, le taux d'hémoglobine reste là aussi dans les normes. Le nombre de lymphocytes diminue avec l'âge spécialement chez les sujets âgés ($p < 0,05$ entre les 75-80 ans et les 25-30 ans et entre les 75-80 ans et les 50-55 ans). La valeur absolue reste néanmoins normale chez les sujets âgés ($1,82 \cdot 10^9/L$ chez les 75-80 ans). Pour tous les autres paramètres (plaquettes, leucocytes dont neutrophiles, éosinophiles, basophiles et monocytes), aucune différence significative n'est observée entre les trois classes d'âge.

Tableau 20 : Numérations Formules Sanguines dans les trois classes d'âge de patients.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons Inter-classes : Mann-Whitney U test (a : $p < 0,05$ entre les classes d'âge 25-30 ans et 50-55 ans, b : $p < 0,05$ entre les classes d'âge 25-30 ans et 75-80 ans, c : $p < 0,05$ entre les classes d'âge 50-55 ans and 75-80 ans).

Moyenne +/- ET	25 - 30 ans (n=30)	50 - 55 ans (n=30)	75 - 80 ans (n=30)
Globules rouges ($10^{12}/L$)	4,76 +/- 0,33 a,b	4,48 +/- 0,38 a,c	4,14 +/- 0,27 b,c
Hémoglobine (g/dL)	13,56 +/- 1,27 b	13,27 +/- 1,21 c	12,30 +/- 0,42 b,c
Plaquettes ($10^9/L$)	250,9 +/- 62,9	238,5 +/- 59,3	242,5 +/- 64,6
Leucocytes ($10^9/L$)	7,13 +/- 1,83	6,81 +/- 1,85	7,6 +/- 2,49
Polynucléaires Neutrophiles ($10^9/L$)	4,42 +/- 1,74	4,12 +/- 1,45	4,95 +/- 2,14
Polynucléaires Eosinophiles ($10^9/L$)	0,19 +/- 0,17	0,17 +/- 0,09	0,17 +/- 0,13
Polynucléaires Basophiles ($10^9/L$)	0,01 +/- 0,02	0,01 +/- 0,03	0,01 +/- 0,03
Lymphocytes ($10^9/L$)	2,02 +/- 0,70 b	1,95 +/- 0,66 c	1,82 +/- 0,60 b,c
Monocytes ($10^9/L$)	0,55 +/- 0,19	0,48 +/- 0,14	0,63 +/- 0,31

2.2. Activité télomérase

Nous avons mesuré l'activité télomérase dans les lymphocytes non-exposés et exposés aux PM_{2.5} à une concentration de 45 µg / mL et mis en culture pendant 72 h.

Nos résultats montrent une activité télomérase plus importante dans les lymphocytes non-exposés aux PM_{2.5} dans la classe d'âge 75-80 ans mais il n'existe pas de différence significative par rapport aux groupes 25-30 ans et 50-55 ans (Figure 42).

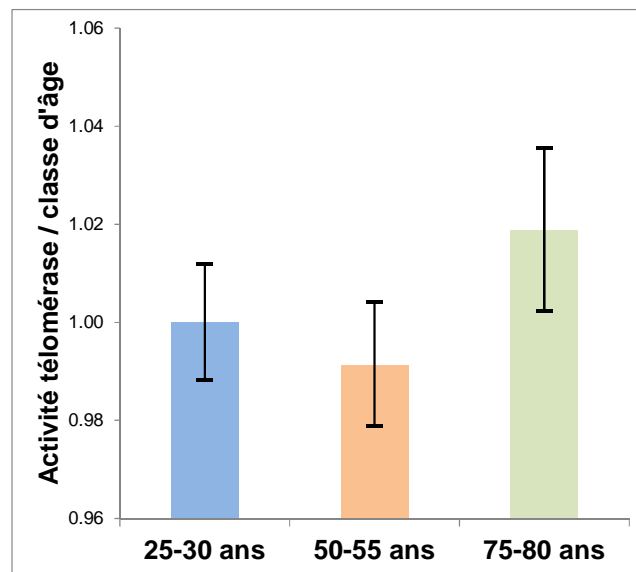


Figure 42 : Activité télomérase, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposées, mesurée sans exposition aux PM_{2.5} après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: p<0,05; **: p<0,01).

Après exposition des cellules, il existe une augmentation significative de l'activité télomérase dans les trois classes d'âge. Ainsi, l'activité télomérase dans les cellules exposées augmente d'un facteur de 1,04 dans la classe d'âge 25-30 ans, d'un facteur de 1,03 dans la classe d'âge 50-55 ans et d'un facteur de 1,06 dans la classe d'âge 75-80 ans par rapport à l'activité mesurée dans les cellules non-exposées (Figure 43).

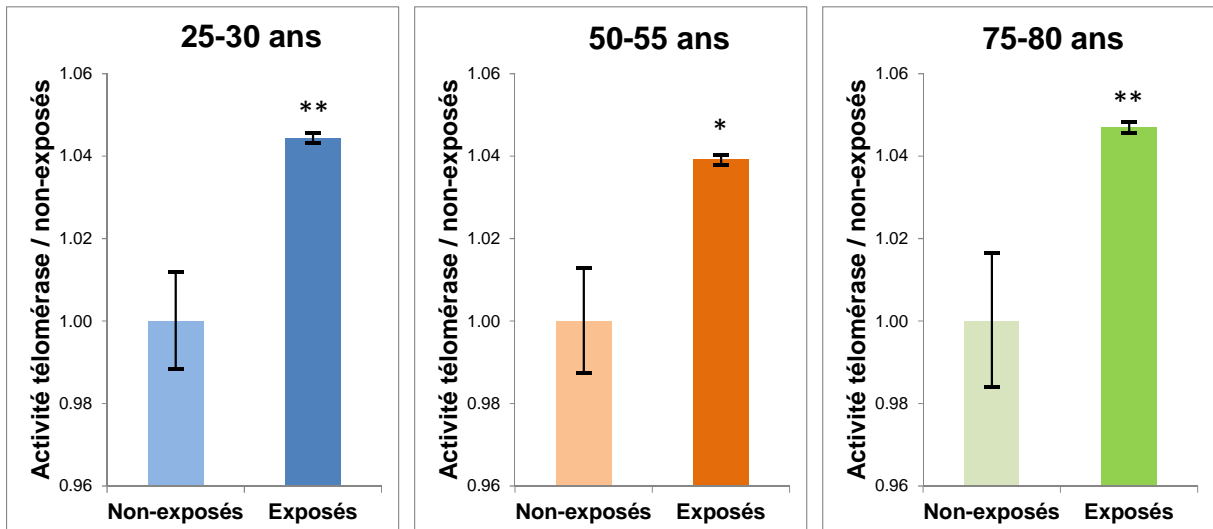


Figure 43 : Activité télomérase, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux PM_{2.5} à une concentration de 45 µg / mL. Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: p<0,05; **: p<0,01).

Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre les trois groupes. L'âge ne semble donc pas avoir d'influence sur l'activité télomérase des cellules non-exposées et exposées à la pollution atmosphérique (Figure 44).

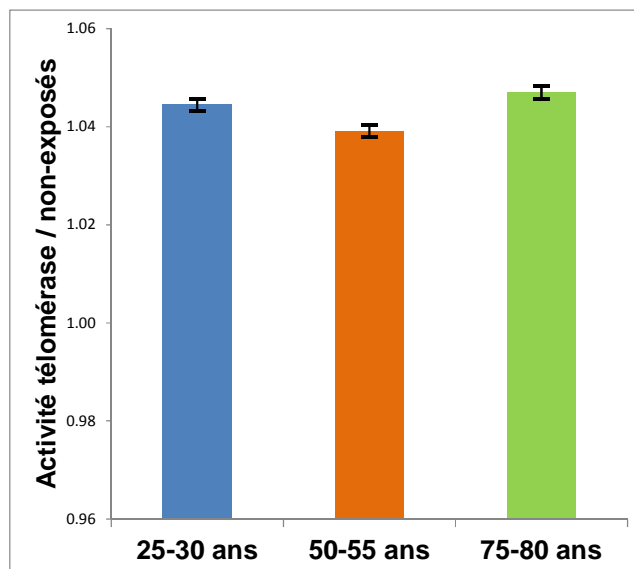


Figure 44 : Activité télomérase des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux PM_{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: p<0,05; **: p<0,01).

2.3. Longueur des télomères

Dans les mêmes conditions que pour l'activité télomérase, nous avons mesuré la longueur des télomères dans les lymphocytes non-exposés et exposés aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$ pendant 72 h dans les trois groupes de patients prélevés.

Dans les lymphocytes non-exposés, la longueur des télomères a tendance à diminuer avec l'âge. Néanmoins, nous n'observons pas de différence significative entre les trois classes d'âge (Figure 45).

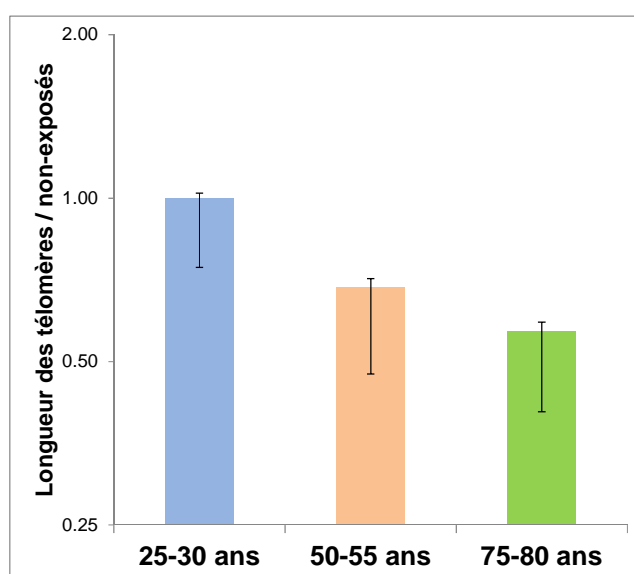


Figure 45 : Longueur des télomères, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposées, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Si nous observons chaque classe d'âge de façon indépendante, nous pouvons remarquer que la longueur des télomères dans les lymphocytes augmente après exposition aux $PM_{2.5}$. Il existe une augmentation d'un facteur 1,31 chez les 25-30 ans, 1,22 chez les 50-55 ans et 1,01 chez les 75-80 ans. Bien qu'il y ait un allongement des télomères des lymphocytes après exposition aux particules fines, cet allongement n'est pas significatif et ce quelle que soit la classe d'âge (Figure 46).

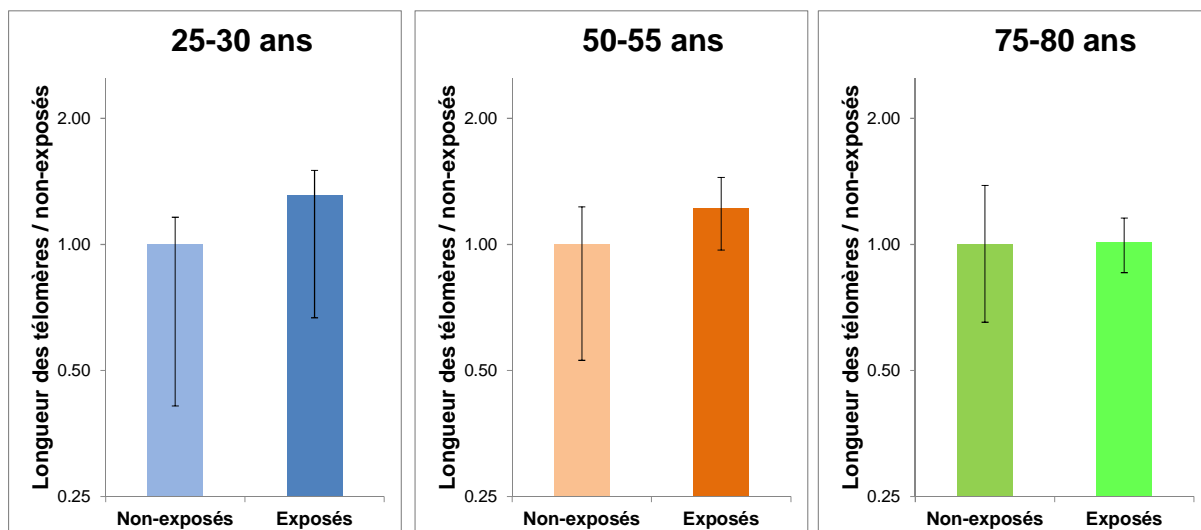


Figure 46 : Longueur des télomères, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Si maintenant nous comparons la longueur des télomères des lymphocytes exposés aux $PM_{2.5}$ en fonction de l'âge, nous pouvons remarquer que les télomères semblent plus courts chez les 75-80 ans. Néanmoins, cette différence entre les classes d'âge n'est pas significative (Figure 47).

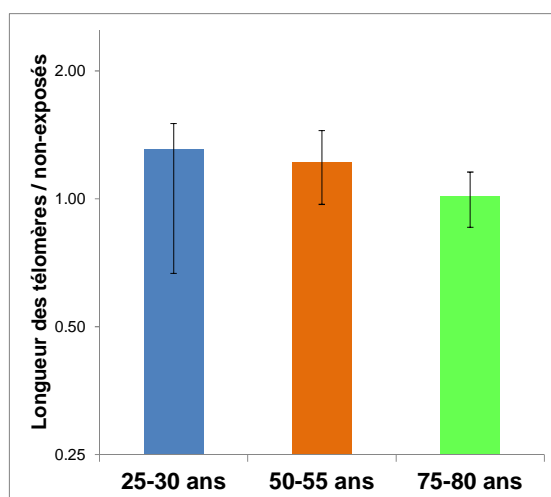


Figure 47 : Longueur des télomères des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Ces premiers résultats mettent plusieurs points en évidence :

- **Activité télomérase**

- **Effets des particules**

- augmentation significative de l'activité télomérase dans toutes les classes d'âge.

- **Influence de l'âge**

- pas d'influence sur l'activité télomérase en présence ou en absence d'exposition aux particules.

- **Longueur des télomères**

- **Effets des particules**

- tendance non significative à l'augmentation de la longueur des télomères dans toutes les classes d'âge.

- **Influence de l'âge**

- Tendance non significative à la diminution de la longueur des télomères quand l'âge augmente en absence d'exposition aux particules. Pas de modifications liées à l'âge en présence de particules.

Les mécanismes épigénétiques conduisent à une variation dans le niveau d'expression des gènes sans en modifier la séquence. Ils sont connus pour être impliqués dans le processus de cancérogenèse, notamment en inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur. Trois mécanismes épigénétiques sont admis à ce jour : la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et les miRNA.

La méthylation d'un promoteur au niveau des îlots CpG a été décrite comme inhibant l'expression du gène qu'il contrôle. Plusieurs gènes peuvent ainsi être « éteints » de manière épigénétique au cours de la cancérogenèse, parmi lesquels P16^{INK4A}, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, et MGMT, codant pour une enzyme de réparation de l'ADN.

Nous avons donc cherché à déterminer le statut de méthylation des promoteurs de ces deux gènes cibles, dans les lymphocytes exposées pendant 72 h aux PM_{2.5} à une concentration de 45 µg / mL.

2.4. Méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$

Nos résultats ne mettent pas en évidence de variation significative du taux de méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$ dans les lymphocytes non-exposés en fonction de la classe d'âge (Figure 48).

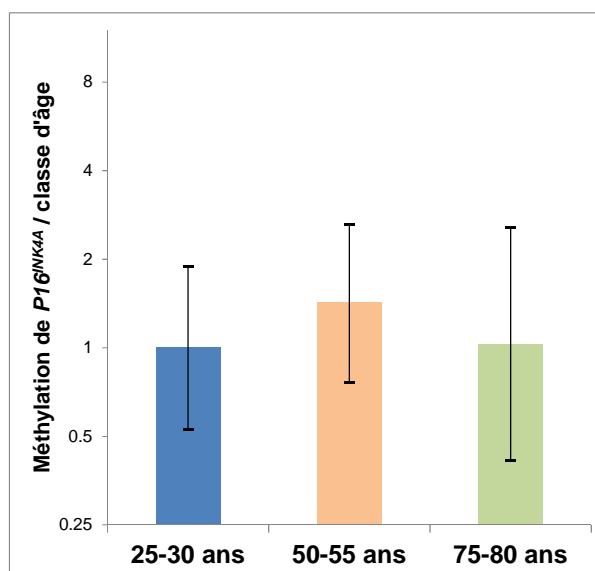


Figure 48 : Méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Après exposition aux $PM_{2.5}$, le ratio normalisé $ADN_{méthylé} / ADN_{non-méthylé}$ montre une augmentation significative du taux de méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$ dans les cellules exposées : 25-30 ans, RQ = 2,82 ($p < 0,01$), 50-55 ans, RQ = 2,01 ($p < 0,01$) et 75-80 ans, RQ = 1,51 ($p < 0,05$) à la concentration de 45 $\mu g / mL$ dans chaque échantillon (Figure 49).

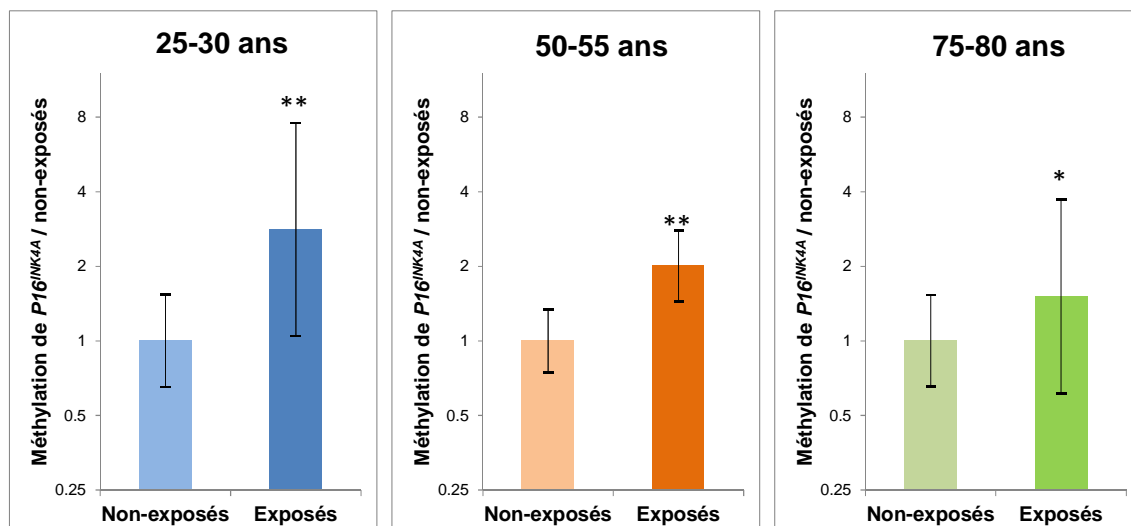


Figure 49 : Méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Comme pour les tests précédents, nous avons comparé les effets des particules selon la classe d'âge. Les comparaisons ne mettent pas en évidence un effet supérieur des particules pour une classe d'âge particulière. Les $PM_{2.5}$ augmentent le taux de méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$ dans les lymphocytes mais l'âge n'a pas d'influence sur l'effet des particules (Figure 50).

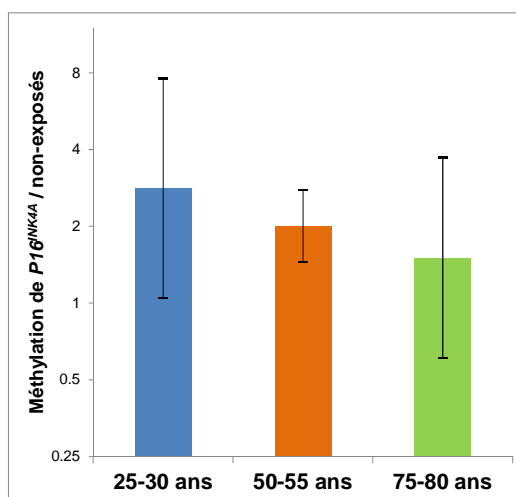


Figure 50 : Méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$ des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), par rapport aux cellules non-exposées, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

2.5. Expression génique de $P16^{INK4A}$

Pour confirmer les résultats obtenus sur la méthylation de promoteur du gène $P16^{INK4A}$, nous avons cherché à savoir si son expression au sein des lymphocytes sanguins était modulée par l'exposition aux particules fines et si l'âge modifiait la toxicité des $PM_{2.5}$.

En absence d'exposition des lymphocytes aux $PM_{2.5}$, l'expression du gène $P16^{INK4A}$ ne varie pas de façon significative avec l'âge (Figure 51).

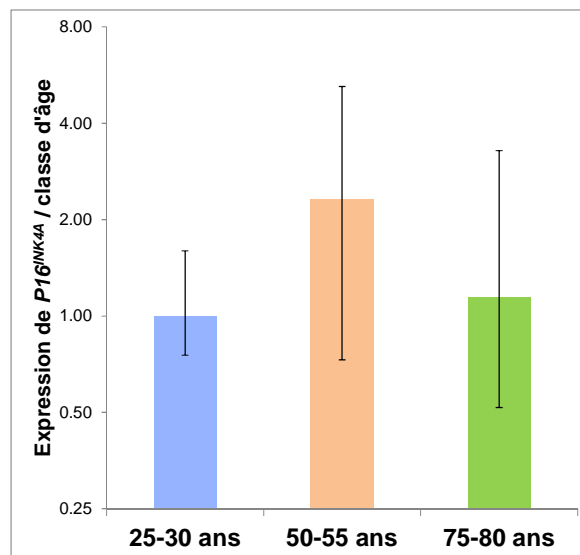


Figure 51 : Expression du gène $P16^{INK4A}$, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

En cas d'exposition aux $PM_{2.5}$, nos résultats montrent une diminution significative de l'expression du gène $P16^{INK4A}$ dans les cellules exposées de la classe d'âge 25-30 ans par rapport aux cellules non-exposées du même groupe (RQ = 0,45 ; $p < 0,01$). Pour les classes d'âge 50-55 ans (RQ = 0,95) et 75-80 ans (RQ = 1,10), les variations, après exposition à la concentration de 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans chaque échantillon, ne sont pas significatives (Figure 52).

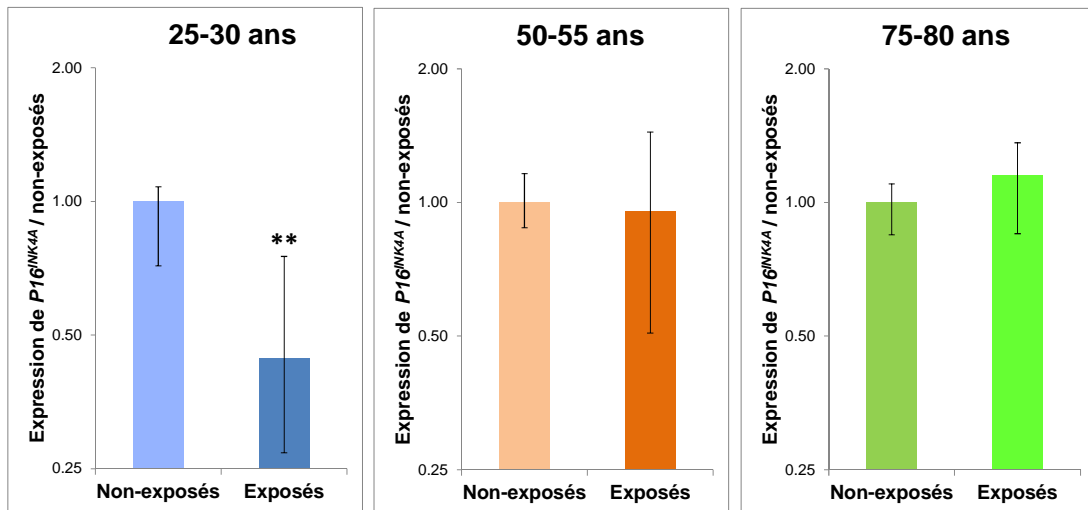


Figure 52 : Expression du gène $P16^{INK4A}$, rapportée aux lymphocytes non-exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans), mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Nous avons ensuite pu évaluer l'influence de l'âge dans l'expression du gène $P16^{INK4A}$ lors de l'exposition des lymphocytes aux particules atmosphériques. Nous avons pu observer des différences significatives entre les classes d'âge 25-30 ans et 50-55 ans ($p < 0,01$) et entre les classes d'âge 25-30 ans et 75-80 ans ($p < 0,01$). L'expression du gène $P16^{INK4A}$ augmente avec l'âge dans les lymphocytes exposés aux $PM_{2.5}$ (Figure 53).

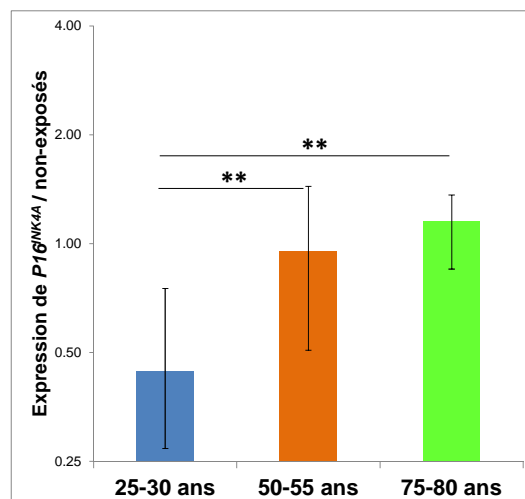


Figure 53 : Expression du gène $P16^{INK4A}$ des lymphocytes exposés de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Ces résultats mettent en avant plusieurs points :

- **Méthylation du promoteur**

- **Effets des particules**

- augmentation significative de la méthylation du promoteur du gène *P16^{INK4A}* dans toutes les classes d'âge

- **Influence de l'âge**

- pas d'influence observée en présence ou en absence d'exposition aux particules.

- **Expression génique**

- **Effets des particules**

- diminution significative de l'expression du gène *P16^{INK4A}* chez les plus jeunes (25-30 ans)

- **Influence de l'âge**

- Augmentation chez les sujets moyens et âgés en cas d'exposition aux particules.

2.6. Méthylation du promoteur de *MGMT*

Nous avons ensuite étudié le niveau de méthylation du promoteur de *MGMT*. Nos résultats montrent un niveau de méthylation des lymphocytes assez variable en fonction de la classe d'âge. Les variations du taux de méthylation du promoteur de *MGMT* dans les cellules non-exposées aux $PM_{2.5}$ sont beaucoup plus importantes que celles observées pour le promoteur de *P16^{INK4A}*. En effet, nous pouvons observer un taux de méthylation du promoteur de *MGMT* significativement plus important dans la classe d'âge 75-80 ans par rapport aux classes d'âge 25-30 ans ($p < 0,01$) et 50-55 ans ($p < 0,01$) (Figure 54).

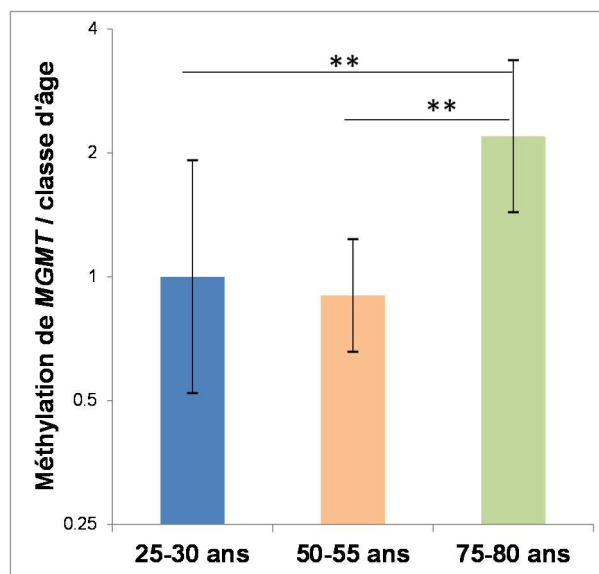


Figure 54 : Méthylation du promoteur de *MGMT*, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Après exposition des lymphocytes aux $PM_{2.5}$, il n'existe pas de variation du taux de méthylation dans les classes d'âge 25-30 ans (RQ = 0,87) et 50-55 ans (RQ=1,26). En effet, seule dans la classe d'âge 75-80 ans, les particules semblent induire une diminution significative du ratio $ADN_{méthylé} / ADN_{non-méthylé}$ (RQ = 0,5 ; $p < 0,01$) (Figure 55). Le sens de variation pourrait conduire à une hypométhylation du promoteur lorsque le patient est le plus âgé.

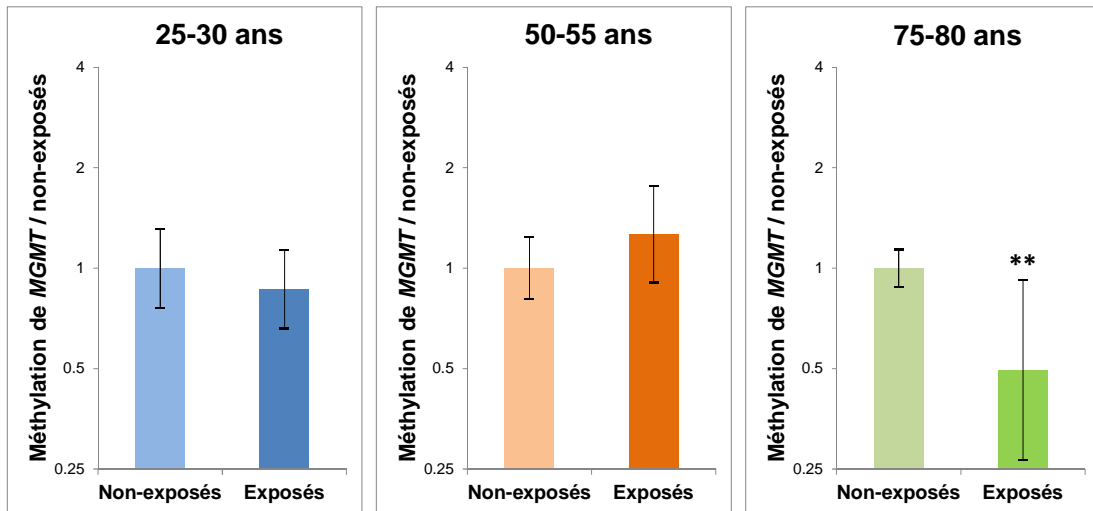


Figure 55 : Méthylation du promoteur de *MGMT*, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

La méthylation du promoteur de *MGMT* diminue significativement dans les lymphocytes exposés aux $PM_{2.5}$ de la classe d'âge 75-80 ans mais reste supérieure d'un facteur 1,41 par rapport à la classe d'âge 25-30 ans (Figure 56). L'âge semble donc avoir une influence sur la méthylation de *MGMT* puisque que l'exposition aux particules augmente significativement l'expression du gène uniquement pour le groupe des sujets âgés.

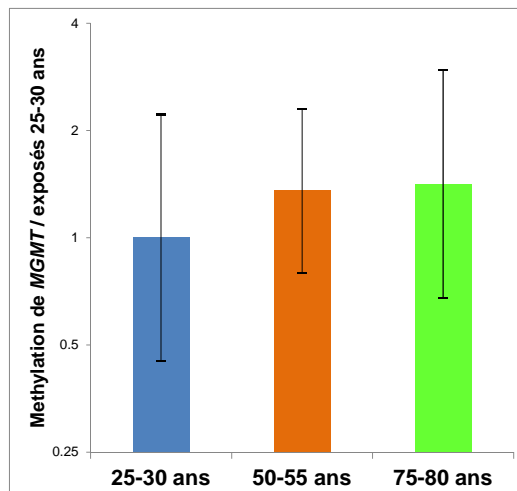


Figure 56 : Méthylation du promoteur de *MGMT*, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

2.7. Expression génique de *MGMT*

De la même manière que pour le gène *P16^{INK4A}*, nous avons étudié l'expression du gène *MGMT* en cas d'exposition ou non des lymphocytes sanguins aux $PM_{2.5}$.

Comme pour la méthylation du promoteur, nos résultats montrent un niveau d'expression génique de *MGMT* dans les lymphocytes assez variable en fonction de la classe d'âge. En effet, nous pouvons observer une expression du gène *MGMT*, en absence d'exposition aux particules, significativement plus basse dans la classe d'âge 75-80 ans par rapport aux classes d'âge 25-30 ans ($p < 0,01$) et 50-55 ans ($p < 0,01$) (Figure 57).

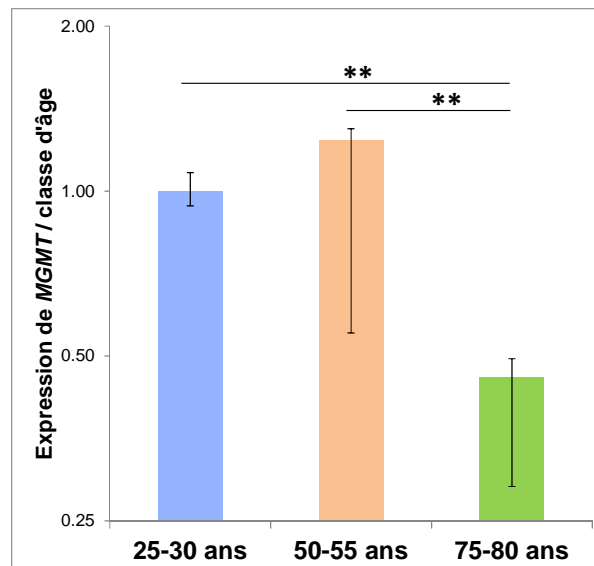


Figure 57 : Expression du gène *MGMT*, rapportée aux lymphocytes 25-30 ans non-exposés, mesurée sans exposition aux $PM_{2.5}$ après 72 h de mise en culture.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Si maintenant nous observons chaque classe d'âge individuellement, nous pouvons remarquer que l'expression du gène *MGMT* ne varie pas après exposition des lymphocytes aux $PM_{2.5}$ dans les classes d'âge 25-30 ans (RQ = 1,04) et 50-55 ans (RQ = 0,97). Au contraire, chez les 75-80 ans, l'expression génique de *MGMT* augmente significativement (RQ = 2,59, $p < 0,01$) (Figure 58).

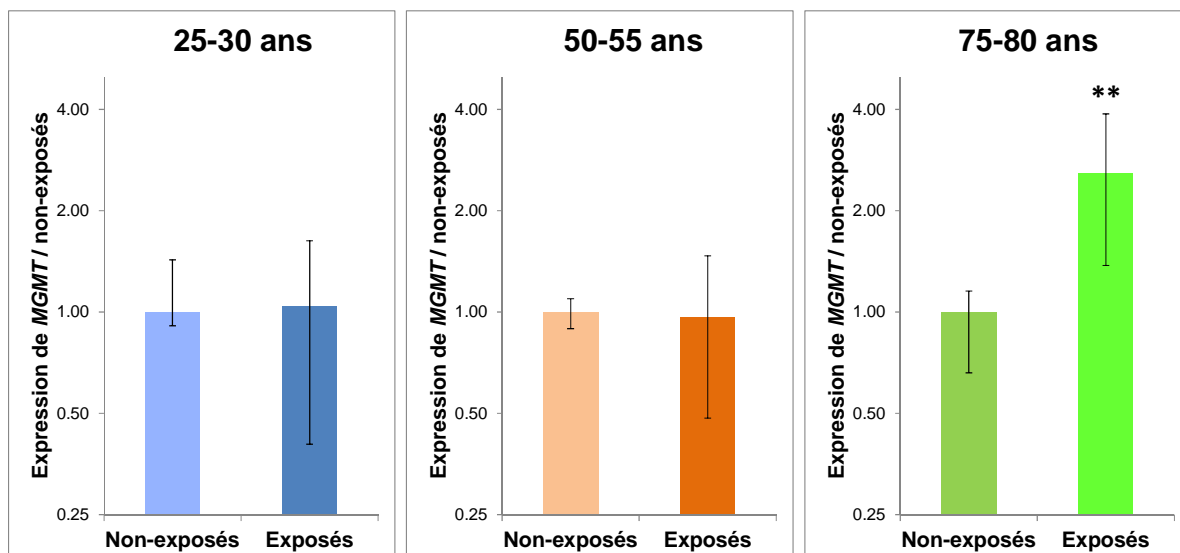


Figure 58 : Expression du gène *MGMT*, rapportée aux lymphocytes de chaque classe d'âge (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans) non-exposés, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Tout en restant légèrement inférieure par rapport à la classe d'âge 25-30 ans, l'expression de *MGMT* augmente significativement dans les lymphocytes exposés aux $PM_{2.5}$ de la classe d'âge 75-80 ans, (Figure 59). L'âge semble donc avoir une influence sur l'expression génique de *MGMT* puisque que l'exposition aux particules augmente significativement l'expression du gène uniquement pour le groupe des sujets âgés.

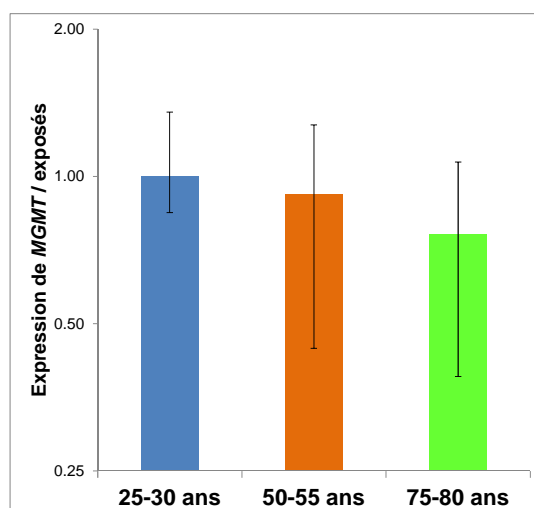


Figure 59 : Expression du gène *MGMT*, rapportée aux lymphocytes exposés de la classe d'âge 25-30 ans, mesurée après 72 h d'exposition aux $PM_{2.5}$ à une concentration de $45 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Moyenne +/- ET, n= 30, Analyses statistiques : Comparaisons inter-classes : Mann-Whitney U test, Comparaisons intra-classes : test de Wilcoxon pour échantillons appariés (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Ces résultats mettent en avant plusieurs points :

- **Méthylation du promoteur**

- **Effets des particules**

- diminution significative chez les patients les plus âgés

- **Influence de l'âge**

- augmentation chez les sujets les plus âgés en absence d'exposition aux particules.
- diminution significative uniquement chez les sujets les plus âgés en cas d'exposition aux particules.

- **Expression génique**

- **Effets des particules**

- augmentation significative chez les patients les plus âgés

- **Influence de l'âge**

- diminution chez les sujets les plus âgés en absence d'exposition aux particules.
- augmentation significative uniquement chez les sujets les plus âgés en cas d'exposition aux particules.

3. Rôle du statut tabagique dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse : Modèle des co-cultures Macrophages Alvéolaires / cellules BEAS-2B exposés au PM_{2.5}

3.1. Caractéristiques des Lavages Broncho-Alvéolaires

Après avoir injecté environ 300 mL, le pourcentage de liquide réaspiré dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) varie classiquement entre 50 et 75 %. Dans notre étude, nous pouvons observer que ce pourcentage est nettement inférieur avec 31 % de recouvrement du LBA pour les fumeurs et 36 % pour les non-fumeurs (Tableau 21). La cellularité normale d'un LBA est comprise entre 50 000 et 250 000 cellules / mL. Dans les deux catégories, fumeurs et non-fumeurs, la cellularité est normale (212 500 cellules / mL pour les fumeurs et 216 364 cellules / mL pour les non-fumeurs) et la différence entre les deux n'est pas significative. Le pourcentage de macrophages dans les LBA est normal (84 +/- 7 %). Il n'existe de différence significative pour aucun de ces paramètres entre les groupes fumeurs et non-fumeurs.

Tableau 21 : Caractéristiques des Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA) chez les fumeurs et non-fumeurs de notre étude.

MA : Macrophage Alvéolaire

	Volume récupéré (mL)	Recouvrement LBA (%)	Cellules / mL	MA (%)	Nombre de MA / mL	Nombre de MA / LBA
Fumeurs	92	31	212 500	80	169 416	15 522 707
Non Fumeurs	107	36	216 364	89	192 564	20 691 838

3.2. Activité télomérase

Nous avons mesuré l'activité télomérase dans les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. Nous allons tout d'abord présenter les effets des $PM_{2.5}$ sur les deux types cellulaires. Chaque résultat est rapporté aux témoins non-exposés non-fumeurs ou fumeurs (Figure 60). Puis dans un second temps, nous allons montrer l'influence du statut tabagique dans la modulation des effets des particules. Chaque résultat est alors rapporté aux témoins non-fumeurs non-exposés (Figure 61).

Dans les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA des non-fumeurs, nous n'observons pas de variation significative de l'activité télomérase quelle que soit la concentration en $PM_{2.5}$ utilisée. Au contraire, dans celles cultivées avec les MA des fumeurs, nos résultats montrent une diminution non significative de l'activité télomérase dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ à la concentration la plus faible. Ainsi, l'activité télomérase dans les cellules exposées à la concentration de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ représente 55 % de celle mesurée dans les cellules non-exposées. De manière intéressante, l'activité télomérase augmente lorsque la concentration en $PM_{2.5}$ passe à 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, pour être à 87 % de l'activité mesurée dans les cellules non-exposées (Figure 60).

Dans les MA de patients non-fumeurs, l'activité télomérase augmente aux deux concentrations en $PM_{2.5}$ pour être comprise entre 146 % (3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$) et 160 % (15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$) de l'activité mesurée dans les MA non-exposées. Ces augmentations d'activité ne sont pas significatives. Chez les MA des fumeurs exposés aux $PM_{2.5}$, nos résultats montrent une diminution significative de l'activité télomérase quelle que soit la concentration en particules utilisées. Ainsi, l'activité télomérase dans les MA de fumeurs exposés représente 51 % à la concentration de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et 37 % à la concentration de 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ de $PM_{2.5}$ ($p < 0,05$) de l'activité mesurée dans les MA non-exposés (Figure 60).

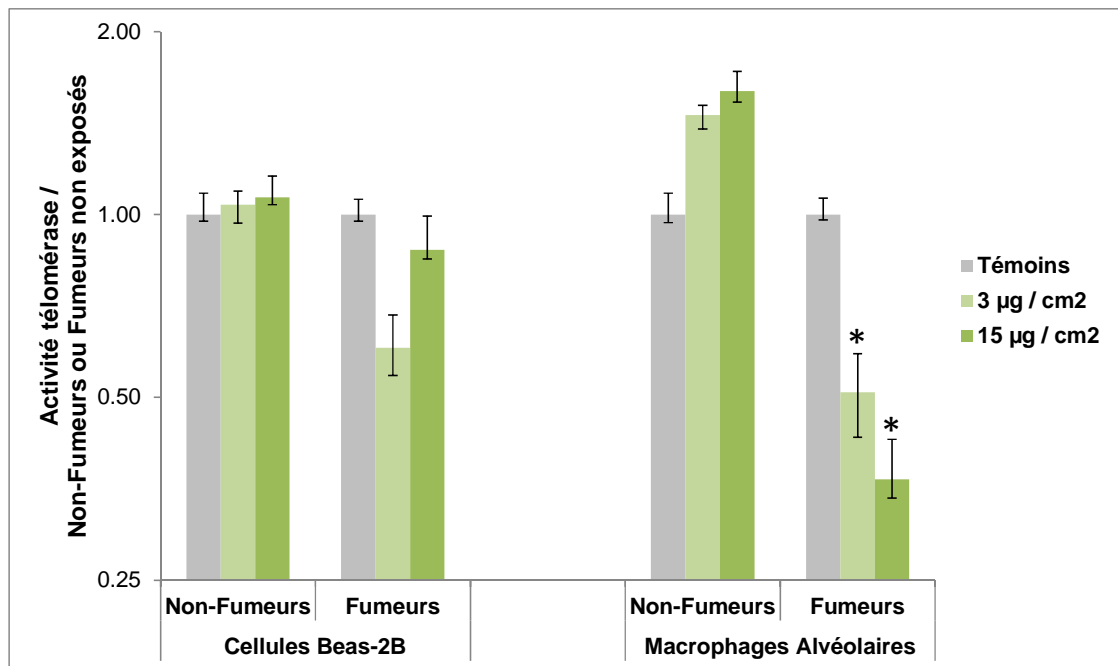


Figure 60 : Activité télomérase des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 et 15 µg / cm², rapportée aux témoins non-exposés.

Médiane [Q1 ;Q3], n= 4, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: p<0,05; **: p<0,01).

L'exposition aux PM_{2.5} n'entraîne pas de variation significative de l'activité télomérase dans les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA des non-fumeurs ou des fumeurs (Figure 60). De manière intéressante, nous pouvons observer une augmentation significative dans l'activité télomérase des cellules BEAS-2B non-exposées entre celles cultivées avec les MA des patients non-fumeurs et celles cultivées avec les MA des patients fumeurs ($p < 0,01$). De plus, cette différence significative est également retrouvée aux deux concentrations d'exposition 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($p < 0,01$) (Figure 61).

Concernant les MA, l'exposition aux PM_{2.5} entraîne une variation significative de l'activité télomérase uniquement chez les patients fumeurs et aux deux concentrations de particules. Par ailleurs, en fonction du statut tabagique du patient, l'activité télomérase diminue significativement à la concentration de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($p < 0,05$) et de 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($p < 0,01$) entre les non-fumeurs et les fumeurs (Figure 61).

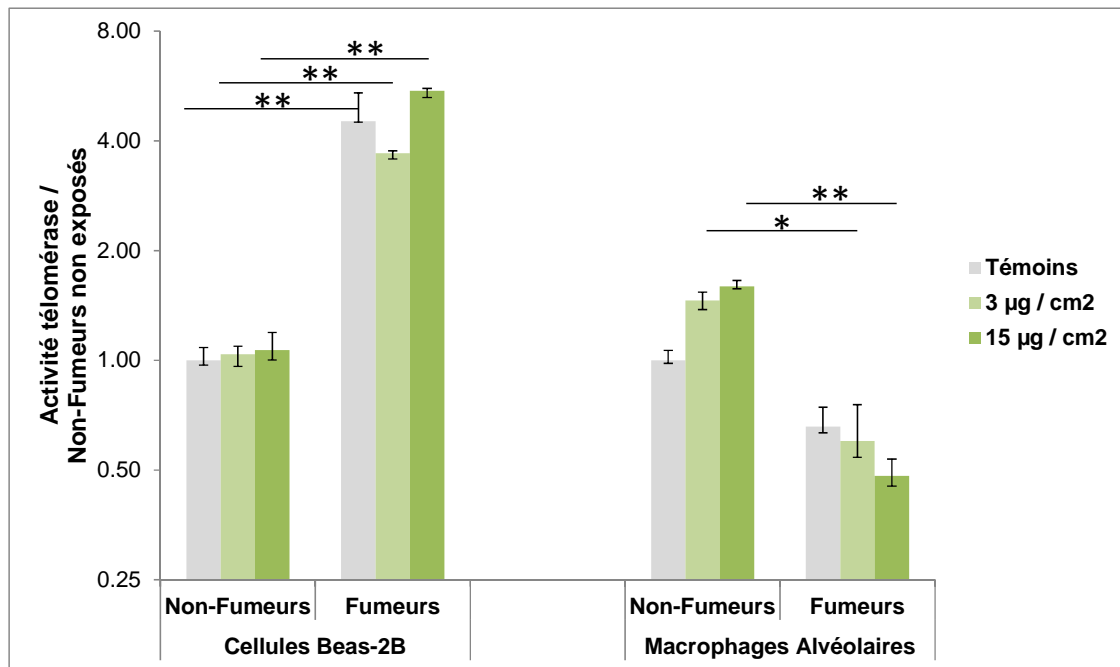


Figure 61 : Activité télomérase des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs.

Médiane [Q1 ; Q3], n = 4, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

3.3. Longueur des télomères

Nous avons ensuite mesuré la longueur des télomères dans les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA exposés pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 ou $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$. Comme précédemment, les effets des $PM_{2.5}$ sur les deux types cellulaires seront tout d'abord mis en évidence en rapportant les résultats aux témoins non-exposés non-fumeurs ou fumeurs (Figure 62), puis l'influence du statut tabagique dans la modulation des effets des particules sera étudiée par rapport aux témoins non-fumeurs non-exposés (Figure 63).

Dans les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA de patients non-fumeurs, nous observons une augmentation significative de la longueur des télomères uniquement pour la concentration en particules la plus faible ($p < 0,05$). Pour la concentration la plus forte en $PM_{2.5}$ ($15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$), il existe une augmentation d'un facteur 1,15, non significative. Dans les BEAS-2B cultivées avec les MA des patients fumeurs, nos résultats montrent une augmentation significative de la longueur des télomères dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ aux deux concentrations par rapport aux cellules non-exposées ($3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$: facteur 4,63, $p < 0,01$) ; $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$: facteur 3,11, $p < 0,01$) (Figure 62).

Dans les MA de patients non-fumeurs, la longueur des télomères augmente significativement à la concentration de $3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($p < 0,01$), mais diminue à la concentration de $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ (0,28 ; $p < 0,01$). Chez les MA de fumeurs exposés aux $PM_{2.5}$, nos résultats montrent une diminution significative à la concentration la plus forte (0,40 ; $p < 0,05$) (Figure 62).

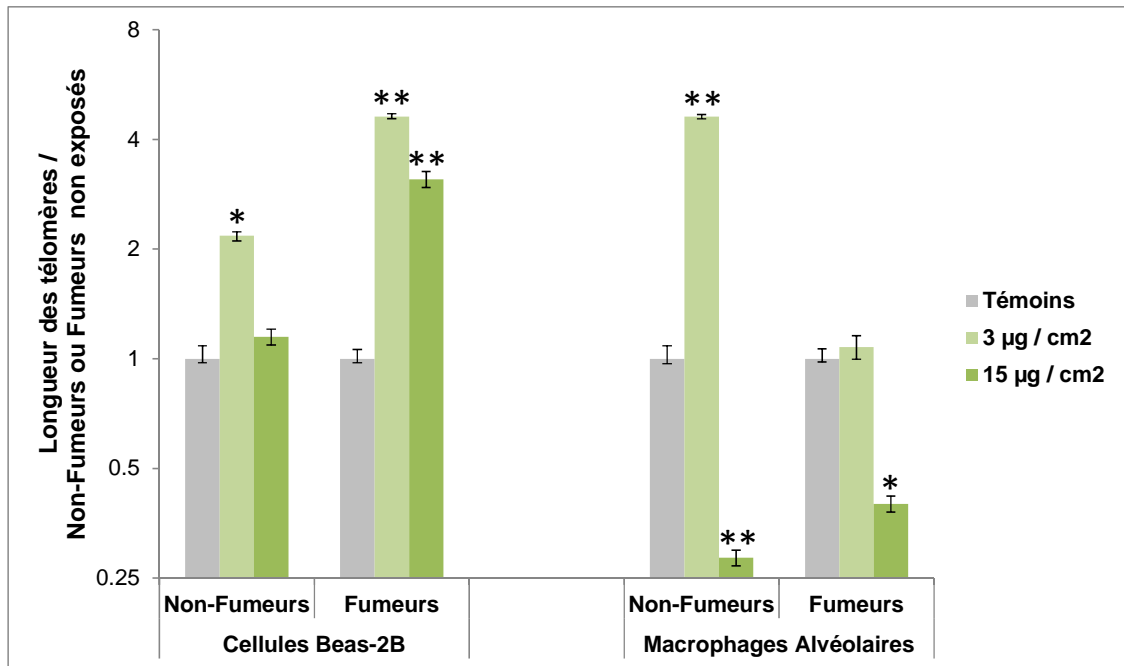


Figure 62 : Longueur des télomères des cellules BEAS-2B et des macrophages alvéolaire exposés pendant 72 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 et 15 µg / cm², rapportée aux témoins non-exposés. Médiane [Q1 ;Q3], n= 4, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: p<0,05; **: p<0,01).

Concernant l'influence du statut tabagique, il n'existe pas de variation significative de la longueur des télomères entre les cellules BEAS-2B cultivées avec les MA de patients non-fumeurs ou fumeurs quelle que soit l'exposition en PM_{2.5} (Figure 63). Au sujet des MA et de l'influence du statut tabagique, nos résultats montrent une diminution significative de la longueur des télomères à la concentration de 3 µg / cm² entre les non-fumeurs et les fumeurs. En absence d'exposition et à la concentration de 15 µg / cm², nous n'avons pas montré de variation significative en fonction du statut tabagique (Figure 63).

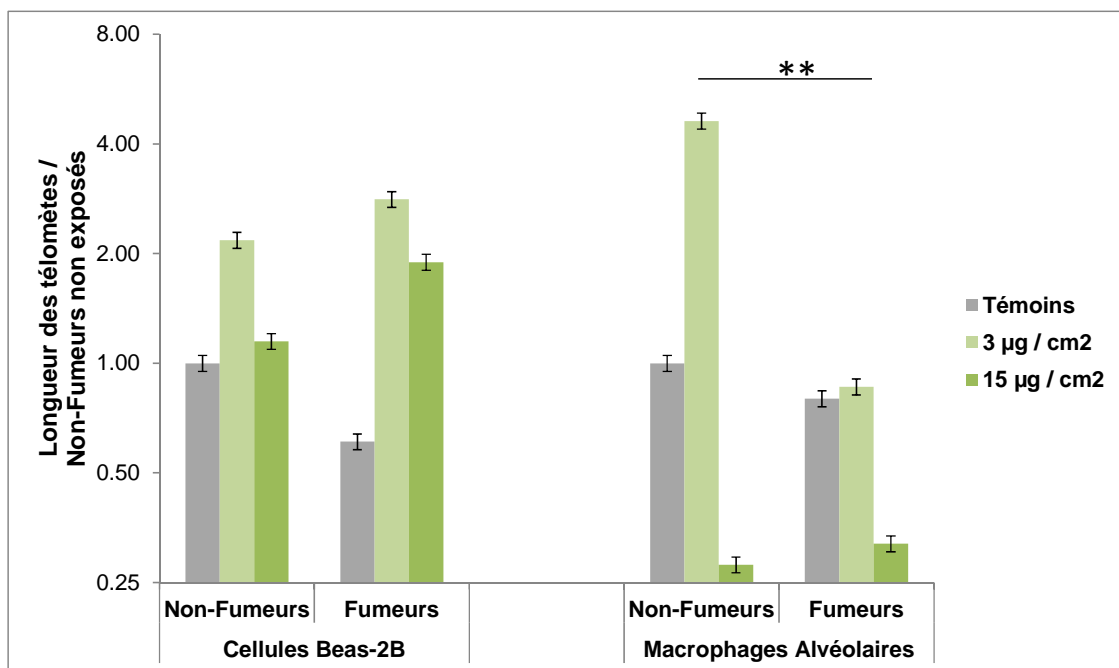


Figure 63 : Longueur des télomères des cellules BEAS-2B et des MA exposés pendant 72 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 et 15 µg / cm² et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs. Médiane [Q1 ;Q3], n= 4, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: p<0,05; **: p<0,01).

Cette première série de résultats montrent :

- **Activité télomérase**

- **Cellules BEAS-2B**

- **Effets des particules :**

- Pas d'effet significatif quelle que soit la concentration en PM_{2.5}.

- **Influence du statut tabagique :**

- Augmentation significative dans les cellules BEAS-2B entre les cellules cultivées avec MA de non-fumeurs et celles cultivées avec MA de fumeurs dans toutes les conditions d'exposition.
 -

- **Macrophages alvéolaires**

- **Effets des particules :**

- **Non-fumeurs :** Pas d'effet significatif ;
 - **Fumeurs :** diminution significative aux deux concentrations d'exposition.

- **Influence du statut tabagique**

- Pas de variation dans les MA non-exposés entre les patients non-fumeurs et fumeurs ;
 - Diminution significative aux deux concentrations de particules entre les non-fumeurs et les fumeurs.

- **Longueur des télomères**

- **Cellules BEAS-2B**

- **Effets des particules :**

- **Cultivées avec MA de non-fumeurs :** augmentation significative uniquement pour la concentration en particules la plus faible ;
- **Cultivées avec MA de Fumeurs :** augmentation significative dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ aux deux concentrations.

- **Influence du statut tabagique**

- Pas de variation significative entre les cellules cultivées avec MA de non-fumeurs et celles cultivées avec MA de fumeurs quelle que soit l'exposition.

- **Macrophages alvéolaires**

- **Effets des particules :**

- **Non-fumeurs :** Augmentation significative à $3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ et diminution significative à $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$;
- **Fumeurs :** Diminution significative à $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$.

- **Influence du statut tabagique**

- Diminution significative à $3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ entre les MA de non-fumeurs et les MA de fumeurs.

3.1. Méthylation des promoteurs de *MGMT* et *P16^{INK4A}*

Nous avons mesuré la méthylation des promoteurs des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* dans les MA cultivés avec les cellules BEAS-2B et exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. N'ayant pas observé de modifications sur les cellules BEAS-2B, les résultats présentés ici concernent uniquement les MA.

L'exposition aux $PM_{2.5}$ n'entraîne pas de variation significative de la méthylation du promoteur de *MGMT* aux deux concentrations d'exposition dans les MA de non-fumeurs et de fumeurs (Figure 64).

Considérant la méthylation du promoteur de *P16^{INK4A}*, chez les non-fumeurs, elle diminue significativement ($p < 0,01$) aux deux concentrations de $PM_{2.5}$ (3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$: 0,39 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$: 0,42). Chez les fumeurs, le niveau de méthylation de *P16^{INK4A}* diminue significativement uniquement à la concentration d'exposition la plus forte (0,44 ; $p < 0,01$) (Figure 64).

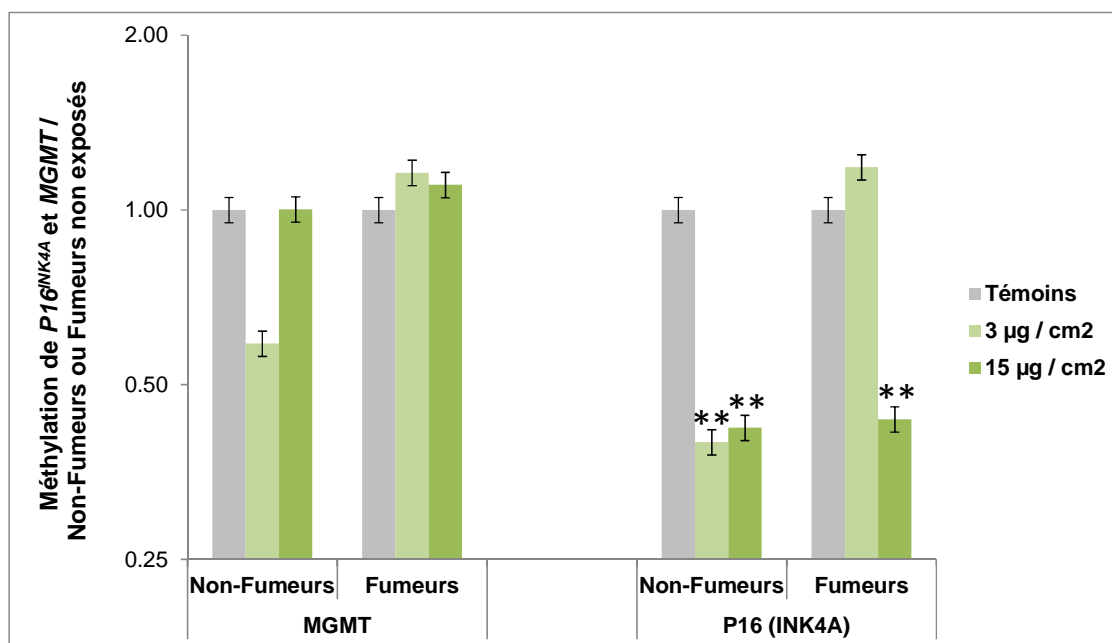


Figure 64 : Méthylation des promoteurs des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, rapportée aux témoins non-exposés.

Médiane [Q1 ;Q3], n= 6, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Concernant l'influence du statut tabagique, nos résultats montrent une augmentation de la méthylation du promoteur du gène *MGMT* entre les non-fumeurs et les fumeurs en absence ou présence d'exposition aux particules. Néanmoins, cette augmentation n'est significative qu'à la concentration d'exposition de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ($p < 0,05$) (Figure 65).

Au niveau de *P16^{INK4A}*, il existe une augmentation de la méthylation du promoteur entre les non-fumeurs et les fumeurs en présence d'exposition aux $\text{PM}_{2.5}$. Comme pour *MGMT*, cette augmentation n'est significative qu'à la concentration d'exposition la plus faible ($p < 0,01$) (Figure 65).

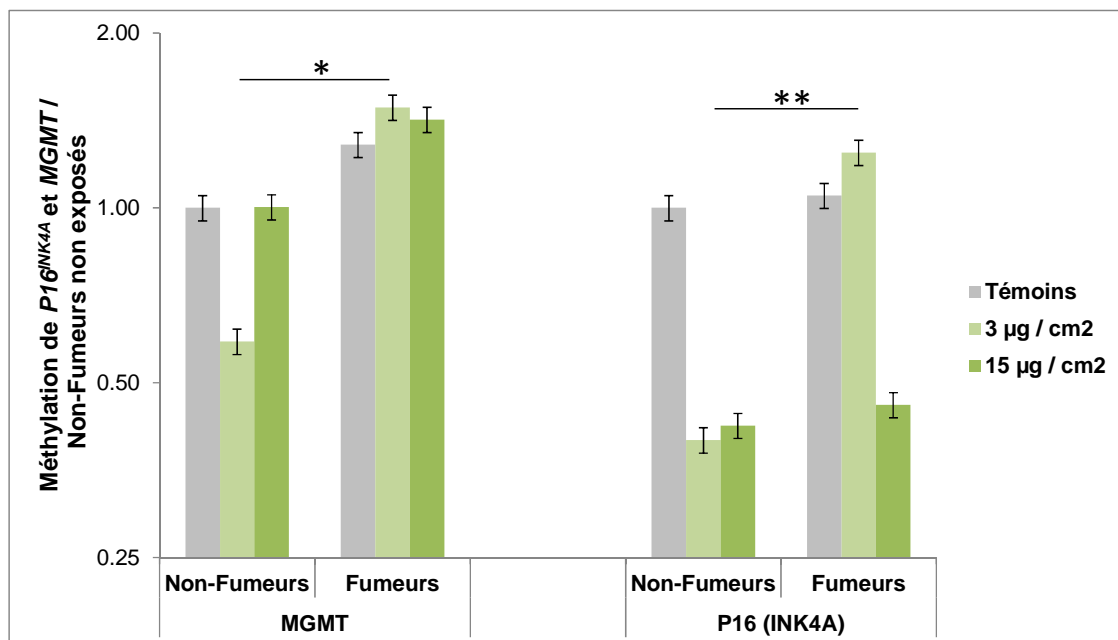


Figure 65 : Méthylation des promoteurs des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* des MA exposés pendant 24 h aux $\text{PM}_{2.5}$ à des concentrations de 3 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs. Médiane [Q1 ;Q3], n= 6, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

3.2. Expression génique de *MGMT* et *P16^{INK4A}*

Comme pour la méthylation des promoteurs, nous avons mesuré le niveau d'expression des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* dans les MA cultivés avec les cellules BEAS-2Bet exposés pendant 24 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 ou 15 µg / cm². Les résultats présentés ne concernent que les MA, puisque l'étude des niveaux d'expression des cellules BEAS-2B n'a pas montré de variation.

L'exposition aux PM_{2.5} à la concentration de 3 µg / cm² entraîne une augmentation de l'expression de *MGMT* chez les non-fumeurs de façon non significative. A 15 µg / cm² d'exposition, il n'y a pas de variation du niveau d'expression génique chez les non-fumeurs. Chez les fumeurs, l'expression du gène *MGMT* ne varie pas après exposition aux particules (Figure 66).

Au sujet de l'expression du gène *P16^{INK4A}*, chez les non-fumeurs, elle augmente significativement ($p < 0,01$) aux deux concentrations testées de PM_{2.5} (3 µg / cm² : 3,05 et 15 µg / cm² : 2,98) par rapport à l'expression mesurée dans les MA non-exposés des non-fumeurs. Chez les fumeurs, le niveau de méthylation de *P16^{INK4A}* augmente significativement uniquement à la concentration d'exposition la plus forte (2,71 ; $p < 0,01$) (Figure 66).

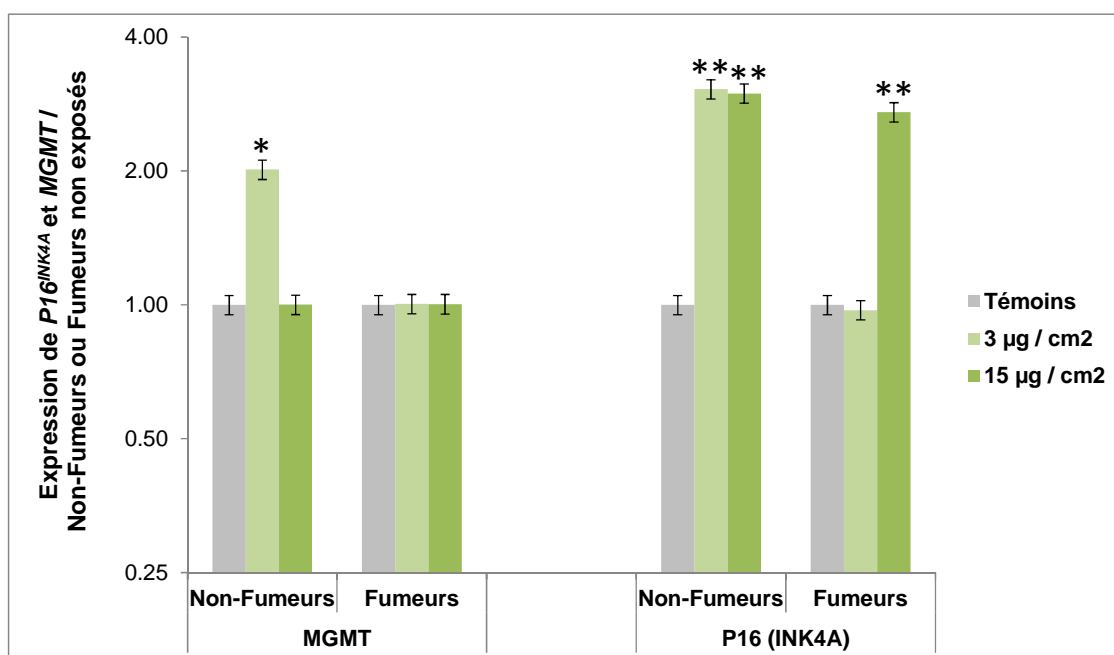


Figure 66 : Expression des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* des MA exposés pendant 24 h aux PM_{2.5} à des concentrations de 3 et 15 µg / cm², rapportée aux témoins non-exposés.

Médiane [Q1 ;Q3], n= 6, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: p<0,05; **: p<0,01).

En ce qui concerne l'influence du statut tabagique, nos résultats ne montrent pas de variation dans le niveau d'expression du gène *MGMT* entre les non-fumeurs et les fumeurs en absence ou en présence d'exposition aux $PM_{2.5}$ (Figure 67).

L'expression génique de *P16^{INK4A}* diminue significativement entre les MA de non-fumeurs et ceux de fumeurs, en cas d'exposition à la concentration la plus faible de $3 \mu g / cm^2$, alors qu'elle augmente après exposition aux $PM_{2.5}$ à la concentration de $15 \mu g / cm^2$ ($p < 0,05$) (Figure 67).

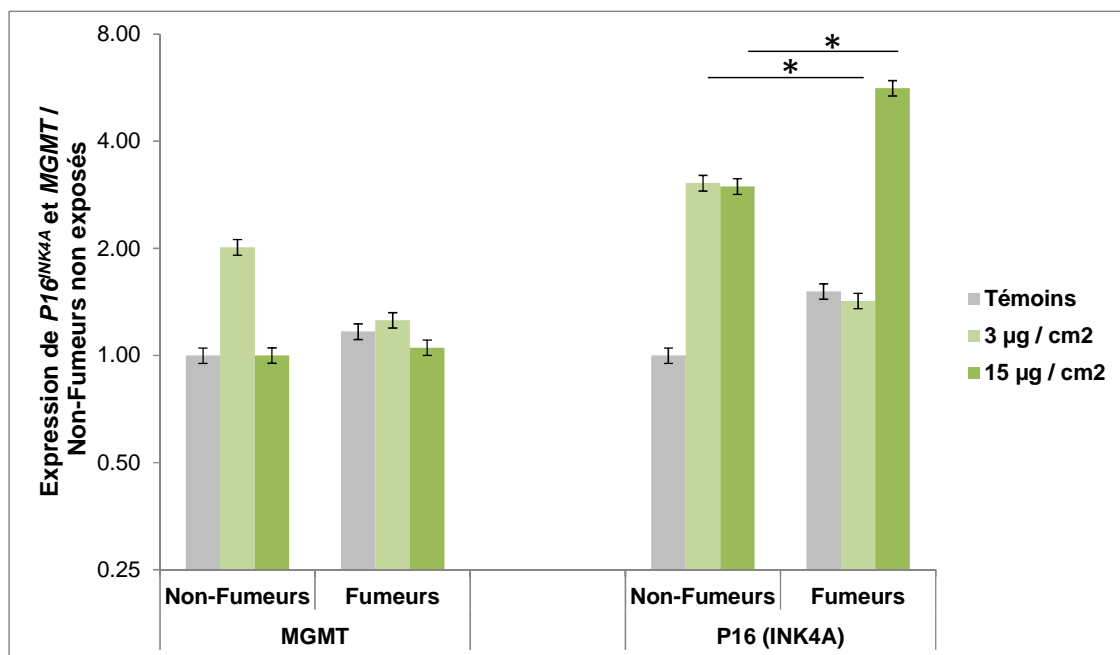


Figure 67 : Expression des gènes *MGMT* et *P16^{INK4A}* des MA exposés pendant 24 h aux $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3 et $15 \mu g / cm^2$ et rapportée aux témoins non-exposés non-fumeurs.

Médiane [Q1 ;Q3], n= 6, Analyses statistiques : test U de Mann-Whitney (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Cette seconde partie de résultats met en évidence au niveau des MA :

- **Gène *MGMT***

- **Méthylation du promoteur**

- **Effets des particules**

- Pas de variation significative quelle que soit l'exposition.

- **Influence du statut tabagique**

- Augmentation entre les non-fumeurs et les fumeurs, quelle que soit l'exposition, significative uniquement à la concentration d'exposition de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

- **Expression génique**

- **Effets des particules**

- **Non-fumeurs** : augmentation significative uniquement à la concentration de 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. A 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$;
- **Fumeurs** : Pas de variation significative quelle que soit l'exposition.

- **Influence du statut tabagique**

- Pas de variation significative quelle que soit l'exposition.

- **Gène *P16^{INK4A}***

- **Méthylation du promoteur**

- **Effets des particules**

- **Non-fumeurs** : diminution significative aux deux concentrations 3 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$;
- **Fumeurs** : diminution significativement uniquement à la concentration d'exposition la plus forte.

- **Influence du statut tabagique**

- Augmentation entre les non-fumeurs et les fumeurs uniquement à la concentration la plus faible des $\text{PM}_{2.5}$.

- **Expression génique**
 - **Effets des particules**
 - **Non-fumeurs** : Augmentation significative aux deux concentrations testées ;
 - **Fumeurs** : Augmentation significative uniquement à la concentration d'exposition la plus forte.
 - **Influence du statut tabagique**
 - Diminution significative entre les non-fumeurs et les fumeurs à la concentration de $3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$;
 - Augmentation entre les non-fumeurs et les fumeurs en cas d'exposition à $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$.

DISCUSSION GENERALE

La pollution atmosphérique, 13^{ème} cause de décès au niveau mondial, représente un problème majeur de santé publique (Ezzati et al., 2002). Ainsi, la pollution de l'air extérieur et les particules atmosphériques ont été classées cancérigènes certains pour l'Homme (Groupe 1) par le Centre International de Recherches sur le Cancer. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans cette cancérigénicité restent à éclaircir. Parmi les polluants présents dans l'atmosphère, les particules se distinguent par leur hétérogénéité compliquant de fait l'étude de leurs mécanismes d'action toxique. D'autres paramètres comme l'âge ou le statut tabagique pourraient influencer sur la toxicité des particules. L'influence de l'âge et du statut tabagique sur les effets toxiques des particules restent par conséquent à approfondir.

Dans ce contexte, notre travail a eu pour objectif d'étudier *ex vivo* les altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancérogenèse après exposition de différents types cellulaires à un échantillon réel de particules fines (PM_{2.5}) et d'étudier l'influence de l'âge et du statut tabagique dans la modulation de la toxicité de ces particules. Les PM_{2.5} ont été prélevées au cours de la saison printemps-été 2011 avant d'être soumises à une caractérisation physico-chimique approfondie. La sélection des particules faite par l'utilisation d'un impacteur en cascade a permis d'obtenir un échantillon unique de PM_{2.5} représentatif de l'exposition classique d'une ville marquée par des activités humaines tertiaires, industrielles et maritimes. C'est ainsi que nous avons retrouvé dans notre prélèvement la présence de métaux, de particules d'échappement diesel et d'aérosols secondaires comme les nitrates et sulfates.

Pour étudier l'influence de l'âge sur les mécanismes cellulaires précoces de cancérogenèse impliqués dans la toxicité des particules atmosphériques, le modèle cellulaire choisi a consisté en l'exposition aux PM_{2.5} de cultures *ex vivo* de lymphocytes sanguins prélevés chez 90 patients issus de 3 classes d'âge différentes (25-30 ans, 50-55 ans et 75-80 ans).

Afin d'évaluer le rôle du statut tabagique dans les altérations impliquées dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire, le modèle cellulaire choisi a consisté en l'exposition

aux PM_{2.5} de coculture de MA et de cellules épithéliales bronchiques de la lignée BEAS-2B. 26 lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés chez des patients fumeurs et non-fumeurs.

Nous nous sommes attachés dans notre travail à l'étude de l'impact de l'exposition à des PM_{2.5} de lymphocytes et de co-cultures MA / cellules BEAS-2B, en orientant notre étude vers les effets génotoxiques (e.g. activité télomérase et longueur des télomères) et la modulation épigénétique de gènes suppresseurs de tumeurs et de réparation de l'ADN (e.g. méthylation du promoteur et expression génique de *P16^{INK4A}* et *MGMT*).

1. Influence de l'âge dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse liés à la toxicité des PM_{2.5}

Dans notre étude, le nombre de lymphocytes diminue significativement dans la classe d'âge 75-80 ans ce qui est en accord avec les données de la littérature et les valeurs attendues d'une NFS. En effet, avec l'âge, le nombre global de lymphocytes diminue mais cette diminution se fait aux dépens de certaines sous-populations lymphocytaires. Les lymphocytes T CD4 sont ainsi diminués de façon constante dans le vieillissement immunitaire (Rea et al., 1996; Rink et al., 1998).

Nous nous sommes intéressés à des effets génotoxiques indirects et notamment à l'activité télomérase dans des lymphocytes exposés aux PM_{2.5}. En effet, la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique permettant le maintien des télomères, dont l'augmentation d'activité est associée à une immortalisation cellulaire dans le cancer du poumon (Young, 2010). Nos résultats ont montré que l'activité télomérase était significativement augmentée dans les cellules exposées aux PM_{2.5} sans différence entre les trois classes d'âge. Plusieurs études de la toxicité de composés chimiques retrouvés dans les PM_{2.5} ont montré des résultats similaires. C'est ainsi que le cadmium induit une augmentation de l'activité télomérase dans les hépatocytes de rat (Dai et al., 2010). En accord avec cette augmentation, nous avons pu voir qu'après exposition aux particules, il existait un allongement des télomères (coefficient de Spearman, rho, positif). Ce coefficient est positif dans toutes les conditions. Cet allongement télomérique peut laisser supposer un début d'immortalisation cellulaire sous l'effet des toxiques. Le temps d'exposition, assez court (72 h), ne permet que quelques cycles de division des lymphocytes pouvant ainsi expliquer que les modifications ne soient pas encore significatives au niveau de la longueur des télomères. Dans la littérature, l'effet des PM_{2.5} sur la longueur des télomères est relativement peu documenté. Ainsi, l'exposition de travailleurs en aciérie à des particules riches en métaux conduit à une augmentation de la longueur des télomères dans les leucocytes (Dioni et al., 2011). Concernant l'influence de l'âge, nous pouvons observer une diminution non significative de la longueur des télomères avec l'âge. Après exposition aux particules, nos résultats montrent un allongement des télomères mais l'âge ne semble pas influencer sur cet effet génotoxique.

Nous avons poursuivi notre travail en étudiant certains mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes font partie intégrante des anomalies moléculaires impliquées dans la cancérogenèse et il a de plus été montré que l'exposition de différents modèles à certains polluants environnementaux pouvait induire des modifications épigénétiques (Baccarelli and Bollati, 2009; Bollati and Baccarelli, 2010). Nous nous sommes donc intéressés aux effets potentiels de nos échantillons de PM_{2.5} sur la méthylation de deux promoteurs de gènes et leur implication décrite ou supposée dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire : *P16^{INK4A}* et *MGMT*.

Le gène *P16^{INK4A}* est un biomarqueur du vieillissement cellulaire qui est surexprimé pendant la sénescence répliquative des lymphocytes (Menzel et al., 2006). *P16^{INK4A}* peut être également activé en réponse au dysfonctionnement des télomères (Jacobs et de Lange, 2004). Une étude a montré que lors de la culture sur plusieurs semaines de lymphocytes sanguins, il existe une augmentation de l'expression de *P16^{INK4A}* avec la sénescence cellulaire, augmentation qui coïncide également avec celle des marqueurs de réparation d'ADN, suggérant un rôle spécial de *P16^{INK4A}* dans la réponse aux altérations de l'ADN dans les lymphocytes (Erickson et al., 1998). De plus, *P16^{INK4A}* a été l'un des premiers gènes pour lesquels une extinction épigénétique a été mise en évidence (Belinsky et al., 1998; Gazzeri et al., 1998; Herman et al., 1995; Merlo et al., 1995). Après exposition des lymphocytes aux PM_{2.5}, nous avons constaté une hyperméthylation du promoteur du gène *P16^{INK4A}*. Ceci est cohérent avec de précédentes études ayant mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* après exposition à différents métaux ou métalloïdes, tels que l'arsenic (Chanda et al., 2006), le chrome (Kondo et al., 2006) et le nickel (Govindarajan et al., 2002), à des produits de combustion du charbon (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2007), ou encore à des PM_{2.5} urbaines (Soberanes et al., 2012) ou riches en métaux (Hou et al., 2011). Cette hyperméthylation impliquerait une voie de signalisation déclenchée par les ROS (Govindarajan et al., 2002; Soberanes et al., 2012). Afin de s'assurer de nos profils de méthylation, nous avons travaillé sur l'expression du gène *P16^{INK4A}* dans les mêmes conditions d'exposition aux particules. Dans notre travail, il n'existe pas de différence dans l'expression génique *P16^{INK4A}* entre les trois classes d'âge de patients non-exposés. Ce résultat est cohérent avec la littérature ; après 72 h de culture, les lymphocytes ne sont pas sénescents même dans la classe d'âge 75-80

ans. Après exposition aux PM_{2.5}, nos résultats montrent une diminution significative de l'expression du gène *P16^{INK4A}* uniquement dans la classe d'âge 25-30 ans. Par ailleurs, il semble que l'expression de ce gène augmente significativement avec l'âge. Nous avons calculé les coefficients de corrélation de Spearman afin de savoir si nos deux variables (méthylation et expression génique) étaient corrélées. Le coefficient de Spearman est négatif mais de façon non significative dans toutes les classes d'âge. Ce résultat de corrélation négative traduit le fait que quand le promoteur gène *P16^{INK4}* est hypométhylé, l'expression du gène est augmentée et inversement. Ainsi, l'étude de la méthylation des promoteurs a mis en évidence une hyperméthylation de *P16^{INK4A}* associée à l'exposition PM_{2.5} dans toutes les classes d'âge, vraisemblablement liée à la présence de ROS (Govindarajan et al., 2002; Soberanes et al., 2012). Par ailleurs, l'hyperméthylation du promoteur du gène *P16^{INK4A}* qui entraîne une répression constitutive de l'expression du gène est observée dans la plupart des cancers (Myöhänen et al., 1998). La diminution de l'expression du gène *P16^{INK4A}* en lien avec l'hyperméthylation de son promoteur liée à l'exposition n'est significativement retrouvée que chez les jeunes. Généralement, *P16^{INK4A}* est transactivé au cours de la sénescence réplivative (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Palmero et al., 1997) et son activation peut également être induite en réponse aux dommages à l'ADN. Nous nous retrouvons donc dans un antagonisme permanent entre sénescence et oncogenèse qui pourrait expliquer nos résultats.

Le gène *MGMT* code pour une enzyme de réparation de l'ADN et a été décrit comme hyperméthylé dans plusieurs types de cancers (Fumagalli et al., 2012; Lin et al., 2014; Song et al., 2013). Cependant, il n'existe que peu de données qui font le lien entre *MGMT* et vieillissement. L'activité globale de *MGMT* semble diminuer avec l'âge tout en restant à des niveaux appréciables dans tous les tissus y compris au niveau pulmonaire et ce tout au long de la vie (Anisimov, 2001; Nakatsuru et al., 1994). En absence d'exposition aux particules, nous avons pu constater dans notre travail que la méthylation du promoteur de *MGMT* était significativement plus haute dans la classe d'âge 75-80 ans que dans les deux autres (25-30 ans et 50-55 ans). En parallèle, l'expression du gène est significativement diminuée dans cette classe d'âge. Comme pour *P16^{INK4}*, nous avons calculé les coefficients de corrélation de Spearman afin de savoir si nos deux variables (méthylation et expression génique) sont corrélées. Le coefficient de Spearman est

négatif mais de façon non significatif dans toutes les classes d'âge. Ces résultats sont en accord avec deux autres études sur le profil de méthylation de *MGMT* réalisé sur des patients de plus de 65 ou 70 ans avec un glioblastome. Ces études ont encouragé le fait de mesurer en routine le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* particulièrement chez ces patients en indiquant un lien direct entre le test de ce biomarqueur et la décision individuelle de traitement (Metellus et al., 2009; Yin et al., 2014). Cette hyperméthylation associée à une diminution de l'expression de ce gène est susceptible d'entraîner des perturbations du cycle cellulaire (Baldi et al., 2011). Concernant l'impact de polluants environnementaux sur la méthylation de *MGMT*, il n'existe que peu d'études mais il semble que celle-ci puisse être augmentée par le sulfure de nickel (Ji et al., 2008) et le radon (Su et al., 2006) et à l'inverse diminuée par les HAP (Duan et al., 2013). Dans notre travail, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans les cellules exposées aux PM_{2.5} sauf dans la classe d'âge 75-80 ans où le taux de méthylation du promoteur de *MGMT* diminue significativement après exposition aux particules. Parallèlement, l'expression génique de *MGMT* est augmentée de façon significative après exposition aux toxiques uniquement chez les patients âgés. **L'âge semble donc avoir une influence sur le profil de méthylation et l'expression génique de *MGMT* puisque que l'exposition aux particules augmente significativement l'expression du gène uniquement pour le groupe des sujets âgés.**

La pollution atmosphérique aux particules fines pourrait ainsi entraîner des modifications génotoxiques et épigénétiques dans des lymphocytes exposés. Ces altérations sont susceptibles de favoriser la promotion tumorale. Dans notre étude expérimentale *ex vivo*, l'âge pourrait moduler dans certains cas ces mécanismes. Malgré l'antagonisme connu entre la sénescence et l'oncogenèse, mesurée par exemple dans l'expression de *P16^{INK4A}*, l'âge pourrait augmenter l'expression du gène *MGMT* après exposition aux particules, en diminuant le niveau de méthylation du promoteur dans le groupe des sujets âgés. En outre, l'ensemble des tests de génotoxicité et épigénétiques ont été conduits sur un temps d'exposition ne permettant qu'un ou deux cycles de division cellulaire. Néanmoins, plusieurs tendances de modifications cellulaires ont pu être observées. Pour améliorer la connaissance concernant l'influence d'âge sur les effets

observés, il serait intéressant d'allonger le temps d'exposition des lymphocytes afin de détecter des lésions importantes et plus stables, comme la longueur des télomères, et ainsi évaluer avec plus de précision l'influence de l'âge sur les altérations liées à la toxicité des particules urbaines.

2. Rôle du statut tabagique dans la modulation des mécanismes cellulaires précoces de cancérogénèse liés à la toxicité des PM_{2.5}

Afin d'étudier la possible synergie des effets nocifs de l'association tabagisme-particules fines au niveau des mécanismes cellulaires impliqués dans la cancérogénèse broncho-pulmonaire, nous avons utilisé un modèle macrophagique en co-culture avec des cellules épithéliales bronchiques de la lignée BEAS-2B afin de reproduire des conditions plus proches de la situation *in vivo*. Pour étudier l'influence du tabagisme, nous avons isolé des MA à partir de LBA réalisés chez des patients non-fumeurs et fumeurs. L'étude cytologique de ces LBA avant exposition aux polluants n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes, même si les fumeurs ont une cellularité plus importante et un pourcentage de MA supérieur, données également retrouvées dans la littérature. Une étude a montré que la cellularité dans un LBA pouvait augmenter d'un facteur deux entre les non-fumeurs et les fumeurs en raison de la présence plus importante de MA (BAL Cooperative Group, 1990).

Comme évoqué précédemment, la télomérase est une reverse transcriptase spécifique chargée de maintenir la longueur des télomères en répliquant l'hexanucléotide TTAGGG (Wyatt et al., 2010). Le rôle joué par la télomérase dans la cancérogénèse est ambivalent, car sa surexpression comme sa sous-expression peuvent avoir des effets délétères. En effet, la surexpression de la télomérase est impliquée dans la résistance à la sénescence cellulaire, permettant ainsi l'immortalisation des cellules (Hanahan and Weinberg, 2011). A l'inverse, une diminution de l'activité télomérase est associée à une instabilité génomique et à une tétraploïdisation des cellules typique des cancers épithéliaux (Frias et al., 2012; Pereira and Ferreira, 2013; Young, 2010). Ces effets *a priori* opposés seraient en fait liés à une chronologie différente, une attrition des télomères précédant la réactivation des télomérases au cours du développement tumoral (Lantuejoul et al., 2010). Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas de variation de l'activité télomérase dans les cellules BEAS-2B exposées aux particules que ce soit dans les cellules cultivées avec les MA des patients fumeurs ou non-fumeurs. Au contraire, l'activité télomérase était significativement diminuée dans les macrophages des fumeurs

exposés aux PM_{2.5} aux deux concentrations 3 µg / cm² et 15 µg / cm². Notre temps d'exposition court (72 h), peut, comme décrit précédemment, expliquer cette diminution de l'activité télomérase (Lantuejoul et al., 2010).

Concernant l'influence du statut tabagique dans la toxicité des PM_{2.5}, nos résultats dans les cellules BEAS-2B ont mis en évidence une augmentation significative de l'activité télomérase entre celles cultivées avec les MA de patients non-fumeurs et celles cultivées avec les MA de patients fumeurs ; non-exposés et exposés aux deux concentrations. De manière surprenante, dans les MA, nous observons une diminution de cette activité télomérase après exposition aux particules entre les non-fumeurs et les fumeurs. Nous avons réalisé cette étude sur la lignée cellulaire BEAS-2B, ayant pour origine un épithélium bronchique humain normal et immortalisé par l'antigène T du virus SV40. Ce choix présente un triple avantage, lié à l'utilisation d'un modèle *in vitro*, au type de cellules sélectionné et aux capacités métaboliques de cette lignée. En effet, une lignée cellulaire constitue un modèle relativement facile à manipuler, tout en permettant d'obtenir des résultats reproductibles. Cette lignée est plus proche des mêmes cellules dans des conditions physiologiques, en comparaison avec une lignée tumorale telle que les cellules A549. Néanmoins, comme dit précédemment, ces cellules ont été immortalisées ce qui peut expliquer une part des différences dans l'activité télomérase entre les cellules BEAS-2B et les MA. Au niveau des MA, l'explication de nos résultats pourrait être le modèle de culture utilisé dans notre travail. En effet, dans notre modèle de co-culture, les macrophages sont directement exposés aux PM_{2.5} alors que les cellules BEAS-2B le sont indirectement, c'est-à-dire qu'elles sont en réalité soumises aux produits des MA en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}. Les MA ont un rôle important dans la défense de l'appareil respiratoire. De ce fait, les MA de fumeurs, potentiellement activés, métabolisent des HAP, élimineraient les toxiques de la fumée de tabac responsables d'une inactivation de la télomérase par la genèse d'un stress oxydant (Grahame and Schlesinger, 2012).

Par la suite, nous avons cherché à savoir si ces variations d'activité télomérase dans les cellules BEAS-2B et dans les MA chez les non-fumeurs et les fumeurs avant et après exposition aux particules atmosphériques avaient des conséquences sur la longueur des télomères. Dans les cellules BEAS-2B, la longueur des télomères augmente après

exposition avec des MA de non-fumeurs et de fumeurs. Au niveau des macrophages, la taille des télomères augmente à la concentration la plus faible de $3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ et diminue significativement à la concentration la plus forte de $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$. Ceci pourrait être lié à une destruction sélective des cellules dont l'activité télomérase était fortement réduite, probablement due à l'extrême instabilité génomique engendrée par le dysfonctionnement des télomères (Frias et al., 2012).

Sur le rôle du statut tabagique comme facteur aggravant la toxicité des particules fines, nos résultats n'ont pas mis en évidence de différences dans la longueur des télomères dans les cellules BEAS-2B cultivées avec des MA de patients non-fumeurs et fumeurs avant ou après exposition aux particules. Au niveau des MA, la seule différence entre les non-fumeurs et les fumeurs est observée après exposition à la concentration la plus faible en particules ; les MA des fumeurs ont des télomères significativement plus courts que ceux des non-fumeurs. L'inactivation de la télomérase via la genèse d'un stress oxydant chez les fumeurs pourrait expliquer cette différence de la longueur des télomères mesurée dans les MA (Grahame and Schlesinger, 2012). Les HAP présents dans la fumée de tabac pourraient également être à l'origine d'une érosion des télomères comme une étude sur des travailleurs exposés de façon chronique aux HAP a pu déjà le montrer (Pavanello et al., 2010).

L'ensemble de ces données souligne la nécessité d'étudier plus en détails les conséquences de l'exposition des $\text{PM}_{2.5}$ sur l'activité télomérase et la longueur des télomères en s'intéressant plus particulièrement à l'effet combiné du tabac. Il conviendrait également de compléter cette étude par une mesure de l'activité télomérase et de la longueur des télomères dans les cellules exposées sur une période de culture plus longue permettant d'appréhender avec plus de précision ces modifications génotoxiques pouvant avoir un impact sur le long terme.

Les résultats de cette étude de génotoxicité permettent de tirer trois conclusions principales. Tout d'abord, nos résultats montrent la capacité des particules à induire des effets délétères potentiellement impliqués dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse. La deuxième conclusion est que le tabagisme influence la nature des effets génotoxiques induits, comme le montrent les différences de résultats entre les échantillons. Enfin, notre étude souligne la particularité du modèle étudié. En effet, ce

modèle en co-culture prend en compte les multiples interactions cellulaires qu'il peut y avoir entre les MA et les cellules épithéliales bronchiques de la lignée BEAS-2B. De plus, les MA sont des cellules qui jouent un rôle particulièrement important dans la défense pulmonaire contre la pollution de l'air, non seulement par l'intermédiaire de la clairance des particules inhalées, mais aussi en contribuant largement à la détoxification de la fraction organique adsorbée à la surface des particules, via son activation métabolique par les enzymes des phases I et II (Castell et al., 2005; Hukkanen et al., 2002). Ces enzymes, et en particulier les cytochromes P450 (CYP), sont présentes dans le parenchyme pulmonaire humain et différents types cellulaires, où elles contribuent à l'activation métabolique *in situ* de certains des polluants organiques (Dahl and Lewis, 1993). Chez l'homme, les COV et les HAP requièrent une activation métabolique pour exercer leur toxicité pulmonaire et sont majoritairement convertis en métabolites électrophiles biologiquement très réactifs par la superfamille des CYP : CYP2E1 et CYP2F1 pour les COV et CYP1A1 pour les HAP (Billet et al., 2007; Dahl and Lewis, 1993; Spivack et al., 2003). Les CYP jouent un rôle important dans la défense du poumon contre les polluants organiques inhalés. Ces enzymes sont connus pour leur caractère inductible par les substrats organiques. La présence de tels substrats dans la fumée de tabac serait susceptible d'activer ces systèmes de détoxification. Enfin, sous l'effet de la fumée de tabac, les MA libèrent des médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-8, LTB₄), des chimiokines (monocyte chemotactic peptide-1, MCP1) et des ROS. Les macrophages activés libèrent également des enzymes à activité élastolytique : des métalloprotéinases (Punturieri et al., 2000; Russell et al., 2002). L'ensemble de ces données peuvent expliquer à la fois les différences observées entre les cellules BEAS-2B et les MA mais également entre les non-fumeurs et les fumeurs.

Nous avons poursuivi notre travail en étudiant certains mécanismes épigénétiques potentiellement impliqués dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire (Adcock et al., 2006; Herman, 2004; Schwartz et al., 2007). Comme précédemment, nous nous sommes intéressés à la méthylation des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT* ainsi qu'à leur expression génique au niveau des MA cultivés en co-culture avec des cellules épithéliales bronchiques de la lignée BEAS-2B.

Comme nous l'avons déjà décrit, le gène *P16^{INK4A}* est un biomarqueur du vieillissement cellulaire, surexprimé lors de la sénescence répliquative (Menzel et al., 2006). *P16^{INK4A}* peut également être activé en réponse au dysfonctionnement des télomères (Jacobs and de Lange, 2004) et est un gène dont l'extinction épigénétique a été fréquemment décrite (Belinsky et al., 1998; Gazzeri et al., 1998; Herman et al., 1995; Merlo et al., 1995). Après exposition aux particules, nous avons constaté une diminution du niveau de méthylation du promoteur du gène *P16^{INK4A}* et ce quelles que soient les concentrations d'exposition chez les non-fumeurs et les fumeurs. Par ailleurs, nous avons pu constater un niveau de méthylation supérieur chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Néanmoins, cette différence n'est significative qu'à la concentration la plus faible de 3 µg / cm². Ceci est cohérent avec de précédentes études ayant mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* chez des patients fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Georgiou et al., 2007; Liu et al., 2006). Cette hyperméthylation pourrait être expliquée par le fait que la fumée de cigarette est l'un des médiateurs environnementaux les plus puissants de la méthylation de l'ADN (Breitling et al., 2011). Afin de s'assurer de nos profils de méthylation, nous avons travaillé sur l'expression du gène *P16^{INK4A}* dans les mêmes conditions d'exposition aux particules. Dans notre travail, il existe une augmentation significative de l'expression génique *P16^{INK4A}* entre les MA de non-fumeurs et de fumeurs après exposition aux PM_{2.5}. Nous avons calculé les coefficients de corrélation de Spearman afin de savoir si nos deux variables (méthylation et expression génique) étaient corrélées. Le coefficient de Spearman est négatif. Ce résultat exprime bien le fait que quand le promoteur gène *P16^{INK4}* est hypométhylé, l'expression du gène est augmentée et inversement.

Le gène *MGMT* code pour une enzyme de réparation de l'ADN et a été décrit comme étant hyperméthylé dans environ 20 % des cancers du poumon (Esteller et al., 1999; Liu et al., 2008; Zochbauer-Muller et al., 2001). Dans notre travail, il n'existe pas de variation significative de la méthylation du promoteur de *MGMT* dans les macrophages exposés aux PM_{2.5}. Par contre, il existe une augmentation significative du niveau de méthylation entre les non-fumeurs et les fumeurs, à la concentration d'exposition la plus faible. Le tabac peut modifier la méthylation de l'ADN par l'intermédiaire d'une hypoxie due au CO qui entre en compétition avec l'oxygène en se liant à l'hémoglobine (Olson,

1984). Cette hypoxie conduit alors à l'augmentation de la synthèse d'un métabolite, la S- adénosylméthionine, acteur majeur dans la méthylation de l'ADN (Liu et al., 2011). Nos résultats sont cohérents avec la littérature. Une étude a ainsi mis en évidence chez des patients avec un cancer du poumon non à petites cellules, une association positive entre une méthylation du promoteur de *MGMT* et statut tabagique (Wu et al., 2008). Comme pour *P16^{INK4}*, nous avons travaillé sur l'expression du gène *MGMT* dans les mêmes conditions d'exposition aux particules. Nos résultats ne montrent aucune variation significative de l'expression génique après exposition aux PM_{2.5}. Concernant l'influence du statut tabagique, il existe une nette diminution de l'expression de *MGMT* entre les non-fumeurs et les fumeurs exposés à la concentration de 3 µg / cm² probablement en relation avec la méthylation du promoteur du gène. Néanmoins, cette diminution n'est pas significative. Chez les témoins et les exposés à la concentration de 15 µg / cm², nous n'avons pas mis en évidence de variation de l'expression génique entre non-fumeurs et fumeurs. Nous avons ensuite calculé les coefficients de corrélation de Spearman afin de savoir si nos deux variables (méthylation et expression génique) sont corrélées. Le coefficient de Spearman est négatif mais de façon non significative dans toutes les conditions.

Notre étude sur ces paramètres épigénétiques nous fournit plusieurs informations. Premièrement, les particules peuvent induire des modifications du profil de méthylation et de l'expression de gènes essentiels fréquemment impliqués dans les étapes de cancérogénèse et dans la régulation du cycle cellulaire. Deuxièmement, le statut tabagique du patient est important puisqu'il semble également modifier les niveaux de méthylation et d'expression génique.

La pollution atmosphérique aux PM_{2.5} pourrait donc entraîner des modifications génotoxiques et épigénétiques dans des cellules BEAS-2B et des MA ; altérations qui peuvent favoriser la promotion tumorale. Dans notre étude, le statut tabagique semble également moduler ces mécanismes. L'ensemble des tests de génotoxicité et épigénétiques a été conduit sur un échantillon de 13 non-fumeurs et 13 fumeurs. Plusieurs tendances de modifications cellulaires ont pu être observées. Toutefois, pour améliorer la connaissance concernant l'influence du statut tabagique sur les effets

observés, il serait intéressant d'augmenter le nombre d'inclusions afin de diminuer la variabilité inter individuelle améliorant ainsi la représentativité de nos résultats. Nous pourrions ainsi évaluer avec plus de précision l'influence du statut tabagique sur les altérations liées à la toxicité des particules fines.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude avait pour objectif d'évaluer *ex vivo* la capacité d'un échantillon réel de particules fines (PM_{2.5}) collectées sous influence urbano-industrielle au cours de la saison printemps-été 2011 à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancérogenèse. De plus, nous nous sommes intéressés à l'âge et au statut tabagique afin de savoir si ces paramètres pouvaient moduler la toxicité des particules. Pour ce faire, nous avons étudié la génotoxicité des PM_{2.5} et leur capacité à induire des altérations épigénétiques avec deux modèles différents ; pour l'influence de l'âge, un modèle de culture de lymphocytes sanguins issus de patients d'âge différents et pour le rôle du statut tabagique un modèle de co-culture de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B / MA issus de patients non-fumeurs et fumeurs.

A l'issue de ce travail, la première constatation est que les PM_{2.5} induisent des atteintes génotoxiques et épigénétiques. Bien que des résultats positifs en réponse aux PM_{2.5} aient déjà été obtenus notamment pour les volets traitant de la mutagénicité des PM_{2.5} (André et al., 2011), de l'activation métabolique des composés organiques (Abbas et al., 2009; Billet et al., 2007, 2008; Val et al., 2013), de la génotoxicité (Abbas et al., 2013; Gualtieri et al., 2011; Perrone et al., 2010) et des altérations épigénétiques (Lepers, 2013), notre étude est, à notre connaissance, la première à mettre en évidence une modulation de la toxicité des PM_{2.5} en fonction de l'âge ou du statut tabagique. L'âge a un effet propre sur la toxicité des particules au niveau de paramètres tels que la méthylation de promoteurs et l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ou de réparation de lésions à l'ADN. Dans notre modèle en co-culture, le tabac module les effets génotoxiques et épigénétiques des PM_{2.5}. Ces lésions du patrimoine génétique et de son environnement sont des modifications décrites dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

Certaines précautions doivent être prises avant d'envisager une perspective plus large de nos résultats. Nous n'avons pas d'information quant au devenir des lésions éventuellement induites. L'intervention des systèmes de réparation pourrait ainsi compenser certains effets toxiques, ou les cellules lésées être trop endommagées pour survivre. En plus de ces considérations biologiques, il est fondamental de rappeler que la

concentration atmosphérique des PM_{2.5} est un paramètre indispensable afin d'évaluer le risque qu'elles représenteraient pour les populations exposées. C'est ainsi qu'un travail réalisé au sein de notre équipe a estimé que les zones avec d'importantes concentrations atmosphériques en PM_{2.5} contenant de fortes quantités de composés organiques associées à la présence de métaux représenteraient un risque important pour la santé humaine (Lepers, 2013).

Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, le travail présenté est une étude toxicologique *ex vivo*. Celle-ci est donc soumise aux limites de ce type d'approche, notamment les questions de représentativité et d'extrapolation des résultats obtenus.

Ainsi, une première perspective à ce travail serait d'améliorer nos modèles d'étude par l'utilisation de temps d'exposition plus longs et d'un nombre de patients plus important. Ces deux paramètres permettraient non seulement de mettre en évidence des altérations toxicologiques plus stables et plus importantes mais aussi d'améliorer la puissance statistique de nos résultats. Une étude financée par la région Nord-Pas-de-Calais, dans la continuité de celle-ci, est actuellement en cours au laboratoire, visant à valider certains effets génotoxiques et épigénétiques d'un échantillon de PM_{2.5} dans un modèle de lymphocytes humains isolés à partir de trois classes d'âge de patients différents. Les prélèvements sanguins seront réalisés en nombre plus important et les lymphocytes mis en culture plus longtemps.

Il conviendra également d'étayer certains des résultats que nous avons obtenus. Cette consolidation passe par l'optimisation de certaines méthodes notamment la méthode de PCR méthylation-spécifique afin de réduire la variabilité de nos résultats. En plus de des modifications spécifiques au niveau des îlots CpG, l'ADN des cellules cancéreuses est globalement hypométhylé (Esteller, 2007). L'étude de la méthylation globale de l'ADN par GC/MS est en cours d'optimisation au sein de notre laboratoire et permettra ainsi d'étayer nos résultats.

Enfin, il serait intéressant d'observer le profil de méthylation de promoteurs et l'expression d'autres gènes (*P14^{ARF}*, *FHIT*, *RASSF1A*, ...), d'étudier des modifications post-traductionnelles d'histones (H3, H4, ...) et d'analyser la dérégulation de certains micro-ARN (miR-21) impliqués dans les étapes précoces de cancérogénèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., and Garçon, G. (2009). Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol Vitro* 23, 37–46.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Andre, V., Gosset, P., Billet, S., Goff, J.L., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., et al. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J. Appl. Toxicol.* 33, 109–119.
- Adcock, I.M., Ford, P., Ito, K., and Barnes, P.J. (2006). Epigenetics and airways disease. *Respir Res* 7, 21–.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., and Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* 72, 1605–1621.
- Ahmad, I., Khan, M.I., Patil, G., and Chauhan, L.K.S. (2012). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of micro- and nano-particles of granite on human lung fibroblast cell IMR-90. *Toxicol. Lett.* 208, 300–307.
- AIRPARIF (2011). Origine des particules en Ile-de-France.
- Akerman, M.E., Chan, W.C.W., Laakkonen, P., Bhatia, S.N., and Ruoslahti, E. (2002). Nanocrystal targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12617–12621.
- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13742–13747.
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Le Goff, J., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., and Sichel, F. (2011). Mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5} issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J. Appl. Toxicol.* JAT 31, 131–138.
- Anisimov, V.N. (2001). Mutant and genetically modified mice as models for studying the relationship between aging and carcinogenesis. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1221–1255.
- Anisimov, V.N. (2003). Aging and cancer in transgenic and mutant mice. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, s883–902.
- Anisimov, V.N. (2007). Biology of aging and cancer. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* 14, 23–31.
- Annals of the ICRP (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP* 24, 1–482.
- Aoki, K., Nakatsuru, Y., Sakurai, J., Sato, A., Masahito, P., and Ishikawa, T. (1993). Age dependence of O₆-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its depletion after carcinogen treatment in the teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Mutat. Res.* 293, 225–231.
- Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* 13, 693–704.
- ATMO-EDM (2006). Cadastre des émissions atmosphériques 2006 (ATMO Nord-Pas-de Calais).
- Ausserlechner, M.J., Obexer, P., Geley, S., and Kofler, R. (2005). G1 arrest by p16INK4A uncouples growth from cell cycle progression in leukemia cells with deregulated cyclin E and c-Myc expression. *Leukemia* 19, 1051–1057.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid

- fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**, 137–158.
- Babizhayev, M.A., Savel'yeva, E.L., Moskvina, S.N., and Yegorov, Y.E. (2011). Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. *Am. J. Ther.* **18**, e209–226.
- Baccarelli, A., and Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* **21**, 243–251.
- BAL Cooperative Group (1990). Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. The BAL Cooperative Group Steering Committee. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**, S169–202.
- Baldi, A., De Luca, A., Esposito, V., Campioni, M., Spugnini, E.P., and Citro, G. (2011). Tumor Suppressors and Cell-Cycle Proteins in Lung Cancer. *Pathol. Res. Int.* **2011**.
- Balkwill, F., Charles, K.A., and Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **7**, 211–217.
- Barouki, R., and Morel, Y. (2001). Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 511–516.
- Bauer, A.K., Faiola, B., Abernethy, D.J., Marchan, R., Pluta, L.J., Wong, V.A., Roberts, K., Jaiswal, A.K., Gonzalez, F.J., Butterworth, B.E., et al. (2003). Genetic susceptibility to benzene-induced toxicity: role of NADPH:quinone oxidoreductase-1. *Cancer Res.* **63**, 929–935.
- Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci US A* **95**, 11891–11896.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Épidémiologie Santé Publique* **56**, 159–175.
- Bessagnet, B., Hodzic, A., Blanchard, O., Lattuati, M., Le Bihan, O., and Marfaing, H. (2005). Origin of particulate matter pollution episodes over the Paris basin in winter. *Atmos. Environ.* **39**, 6159–6175.
- Billet, S. (2008). Caractérisation physico-chimique d'un aérosol d'origine urbano-industrielle (PM2.5), activation métabolique, génotoxicité et spectre mutationnel de TP53.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., and Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM2.5): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res.* **105**, 212–223.
- Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., Andre, V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., et al. (2008). Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM 2.5) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* **270**, 144–155.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21.
- Bliefer, C., and Perraud, R. (2009). Chimie de l'environnement (De Boeck Université, Bruxelles).
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction

- of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
- Bollati, V., and Baccarelli, A. (2010). Environmental epigenetics. *Hered. Edinb* 105, 105–112.
- Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, L., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., Byun, H.-M., Jiang, J., Marinelli, B., Pesatori, A.C., et al. (2007). Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.* 67, 876–880.
- Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., Pegoraro, V., Motta, V., Tarantini, L., Cantone, L., et al. (2010). Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ. Health Perspect.* 118, 763–768.
- Boorman, G.A., Luster, M.I., Dean, J.H., and Wilson, R.E. (1980). The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse on macrophage function and numbers. *J. Reticuloendothel. Soc.* 28, 547–560.
- Borm, P.J., and Driscoll, K. (1996). Particles, inflammation and respiratory tract carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 88, 109–113.
- Bøyum, A. (1968). A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* 97, 51–76.
- Brambilla, E. (2002). Classification of broncho-pulmonary cancers (WHO 1999). *Rev. Mal. Respir.* 19, 455–466.
- Breitling, L.P., Yang, R., Korn, B., Burwinkel, B., and Brenner, H. (2011). Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 450–457.
- Brodsky, L., Peng, W., Kuo, M.H., Salnikow, K., Zoroddu, M., and Costa, M. (2000). Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation. *Cancer Res.* 60, 238–241.
- Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., 3rd, Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., et al. (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121, 2331–2378.
- Brown, J.S., Zeman, K.L., and Bennett, W.D. (2002). Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1240–1247.
- Brüske-Hohlfeld, I. (2009). Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 472, 3–23.
- Bui, P.H., Hsu, E.L., and Hankinson, O. (2009). Fatty acid hydroperoxides support cytochrome P450 2S1-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Mol. Pharmacol.* 76, 1044–1052.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Calderón-Garcidueñas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T.M., Osnaya, N., Monroy, S., DEL Tizapantzi, M.R., Carson, J.L., Villarreal-Calderon, A., et al. (2002). Air pollution and brain damage. *Toxicol. Pathol.* 30, 373–389.
- Cantone, L., Nordio, F., Hou, L., Apostoli, P., Bonzini, M., Tarantini, L., Angelici, L., Bollati, V., Zanobetti, A., Schwartz, J., et al. (2011). Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers. *Environ. Health Perspect.* 119, 964–969.
- Del Carmen, E.M., Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Damián-Matsumura, P., Zaga, V., and Gutiérrez-Ruiz, M.C. (2002). Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 170, 63–73.

- Castell, J.V., Donato, M.T., and Gómez-Lechón, M.J. (2005). Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* 57 *Suppl 1*, 189–204.
- Cawthon, R.M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e47.
- Cawthon, R.M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 37, e21.
- Chanda, S., Dasgupta, U.B., Guhamazumder, D., Gupta, M., Chaudhuri, U., Lahiri, S., Das, S., Ghosh, N., and Chatterjee, D. (2006). DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 89, 431–437.
- Chazette, P. (2004). Aérosol anthropique : impact climatique et environnemental. *Tech. L'Ingénieur* 10, 11–21.
- Chen, C., Yin, N., Yin, B., and Lu, Q. (2011). DNA methylation in thoracic neoplasms. *Cancer Lett.* 301, 7–16.
- Chen, H., Li, S., Liu, J., Diwan, B.A., Barrett, J.C., and Waalkes, M.P. (2004). Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 25, 1779–1786.
- Chen, H., Ke, Q., Kluz, T., Yan, Y., and Costa, M. (2006). Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3728–3737.
- Chervona, Y., Hall, M.N., Arita, A., Wu, F., Sun, H., Tseng, H.-C., Ali, E., Uddin, M.N., Liu, X., Zoroddu, M.A., et al. (2012). Associations between arsenic exposure and global posttranslational histone modifications among adults in Bangladesh. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 21, 2252–2260.
- CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. *Monographies du CIRC sur l'évaluation des risques de cancérogénicité pour l'homme.* 57, 1993.
- CITEPA (2012). Rapport SECTEN, Inventaire des émissions de polluants dans l'atmosphère en France (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique).
- Collins, L.G., Haines, C., Perkel, R., and Enck, R.E. (2007). Lung cancer: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician* 75, 56–63.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Cuozzo, C., Porcellini, A., Angrisano, T., Morano, A., Lee, B., Di Pardo, A., Messina, S., Iuliano, R., Fusco, A., Santillo, M.R., et al. (2007). DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. *PLoS Genet.* 3, e110.
- Dahl, A.R., and Lewis, J.L. (1993). Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33, 383–407.
- Dai, W., Chen, H., Yu, R., He, L., Chen, B., and Chen, X. (2010a). Effects of cadmium on telomerase activity, expressions of TERT, c-myc and P53, and apoptosis of rat hepatocytes. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 30, 709–713.
- Dai, W., Chen, H., Yu, R., He, L., Chen, B., and Chen, X. (2010b). Effects of cadmium on telomerase activity, expressions of TERT, c-myc and P53, and apoptosis of rat hepatocytes. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*

- Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban 30, 709–713.
- Daidoji, T., Gozu, K., Iwano, H., Inoue, H., and Yokota, H. (2005). UDP-glucuronosyltransferase isoforms catalyzing glucuronidation of hydroxy-polychlorinated biphenyls in rat. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 1466–1476.
- Dellinger, B., Pryor, W.A., Cueto, R., Squadrito, G.L., Hegde, V., and Deutsch, W.A. (2001). Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1371–1377.
- Deltour, S., Chopin, V., and Leprince, D. (2005). [Epigenetics and cancer]. *Médecine Sci. MS* 21, 405–411.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., and Ding, W. (2013). PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 1762–1770.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., and Garçon, G. (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). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919.
- Di, Y.P., Zhao, J., and Harper, R. (2012). Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1. *J. Biol. Chem.* 287, 27948–27958.
- Diaz-Sanchez, D., Tsien, A., Fleming, J., and Saxon, A. (1997). Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 2406–2413.
- Ding, X., and Kaminsky, L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 149–173.
- Dioni, L., Hoxha, M., Nordio, F., Bonzini, M., Tarantini, L., Albetti, B., Savarese, A., Schwartz, J., Bertazzi, P.A., Apostoli, P., et al. (2011). Effects of short-term exposure to inhalable particulate matter on telomere length, telomerase expression, and telomerase methylation in steel workers. *Environ. Health Perspect.* 119, 622–627.
- Donaldson, K., Beswick, P.H., and Gilmour, P.S. (1996). Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicol. Lett.* 88, 293–298.
- Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour, P.S., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Rahman, I., Faux, S.P., Brown, D.M., et al. (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1369–1382.
- Dordevic, D., Vukmirovic, Z., Tosic, I., and Unkasevic, M. (2004). Contribution of dust transport and resuspension to particulate matter levels in the Mediterranean atmosphere. *Atmos. Environ.* 38, 3637–3645.
- DREAL (2010). L'industrie au regard de l'environnement (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement).
- DREAL (2013). Plan de protection de l'atmosphère (Direction régionale de l'environnement de l'aménagement et du logement Nord - Pas de Calais).
- Drent, M., Jacobs, J.A., Cobben, N.A., Costabel, U., Wouters, E.F., and Mulder, P.G. (2001). Computer program supporting the diagnostic accuracy of cellular BALF analysis: a new release. *Respir. Med.* 95, 781–786.

- Duan, H., He, Z., Ma, J., Zhang, B., Sheng, Z., Bin, P., Cheng, J., Niu, Y., Dong, H., Lin, H., et al. (2013). Global and MGMT promoter hypomethylation independently associated with genomic instability of lymphocytes in subjects exposed to high-dose polycyclic aromatic hydrocarbon. *Arch. Toxicol.* *87*, 2013–2022.
- Effros, R.B., and Pawelec, G. (1997). Replicative senescence of T cells: does the Hayflick Limit lead to immune exhaustion? *Immunol. Today* *18*, 450–454.
- Elder, A., and Oberdörster, G. (2006). Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin. Occup. Environ. Med.* *5*, 785–796.
- El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., and Hamdy, M.A. (2001). Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *15*, 207–214.
- Erickson, S., Sangfelt, O., Heyman, M., Castro, J., Einhorn, S., and Grandér, D. (1998). Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene* *17*, 595–602.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 286–298.
- Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* *59*, 793–797.
- Esteller, M., Cordon-Cardo, C., Corn, P.G., Meltzer, S.J., Pohar, K.S., Watkins, D.N., Capella, G., Peinado, M.A., Matias-Guiu, X., Prat, J., et al. (2001). p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res.* *61*, 2816–2821.
- Ezzati, M., Lopez, A.D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S., Murray, C.J.L., and Comparative Risk Assessment Collaborating Group (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* *360*, 1347–1360.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *269-270*, 108–115.
- Fiorito, F., Cantiello, A., Granato, G.E., Marfè, G., Ciarcia, R., Florio, S., Pagnini, U., De Martino, L., and Iovane, G. (2014). Modulation of telomerase activity, bTERT and c-Myc induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during Bovine Herpesvirus 1 infection in MDBK cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *28*, 24–30.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., et al. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* *37*, 391–400.
- Fraga, M.F., Agrelo, R., and Esteller, M. (2007). Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1100*, 60–74.
- Frias, C., Pampalona, J., Genesca, A., and Tusell, L. (2012). Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci* *17*, 2181–2196.
- Fry, W.A., Phillips, J.L., and Menck, H.R. (1999). Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* *86*, 1867–1876.
- Fumagalli, C., Pruneri, G., Possanzini, P., Manzotti, M., Barile, M., Feroce, I., Colleoni, M., Bonanni, B., Maisonneuve, P., Radice, P., et al. (2012). Methylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase

- (MGMT) promoter gene in triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* *134*, 131–137.
- Gaykalova, D., Vatapalli, R., Glazer, C.A., Bhan, S., Shao, C., Sidransky, D., Ha, P.K., and Califano, J.A. (2012). Dose-dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS. *PLoS One* *7*, e40389.
- Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1998). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* *16*, 497–504.
- Georgiou, E., Valeri, R., Tzimagiorgis, G., Anzel, J., Krikelis, D., Tsilikas, C., Sarikos, G., Destouni, C., Dimitriadou, A., and Koudou, S. (2007). Aberrant p16 promoter methylation among Greek lung cancer patients and smokers: correlation with smoking. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* *16*, 396–402.
- Getliffe, K.M., Al Dulaimi, D., Martin-Ruiz, C., Holder, R.L., von Zglinicki, T., Morris, A., and Nwokolo, C.U. (2005). Lymphocyte telomere dynamics and telomerase activity in inflammatory bowel disease: effect of drugs and smoking. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *21*, 121–131.
- Gibney, E.R., and Nolan, C.M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity* *105*, 4–13.
- Gil, M.E., and Coetzer, T.L. (2004). Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol. Biotechnol.* *27*, 169–172.
- Glikson, M., Rutherford, S., Simpson, R., Mitchell, C.A., and Yago, A. (1995). Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmos. Environ.* *29*, 549–562.
- Gotoh, O. (2012). Evolution of cytochrome p450 genes from the viewpoint of genome informatics. *Biol. Pharm. Bull.* *35*, 812–817.
- Govindarajan, B., Klafter, R., Miller, M.S., Mansur, C., Mizesko, M., Bai, X., LaMontagne, K., Jr, and Arbiser, J.L. (2002). Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase. *Mol. Med. Camb. Mass* *8*, 1–8.
- Grahame, T.J., and Schlesinger, R.B. (2012). Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Part. Fibre Toxicol.* *9*, 21.
- Grinn-Gofron, A., and Rapiejko, P. (2009). Occurrence of *Cladosporium* spp. and *Alternaria* spp. spores in western, northern and central-eastern Poland in 2004–2006 and relation to some meteorological factors. *Atmospheric Res* *747–758*.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., and Holme, J.A. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* *713*, 18–31.
- Han, L., Lin, I.G., and Hsieh, C.L. (2001). Protein binding protects sites on stable episomes and in the chromosome from de novo methylation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3416–3424.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 859–867.
- Harrison, R.M., and Yin, J. (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci. Total Environ.* *249*, 85–101.
- Harrison, R., Jones, A., and Lawrence, R. (2004). Major component composition of

- PM10 and PM2.5 from roadside and urban background sites. *Atmos. Environ.* 38.
- HAS (1997). Lecture critique de l'hémogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques.
- Hecht, S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1194–1210.
- Heintzenberg, J. (1989). Fine particles in the global troposphere. A review. *Tellus* 41B, 149–160.
- Herman, J.G. (2004). Epigenetics in lung cancer: focus on progression and early lesions. *Chest* 125, 119S–22S.
- Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349, 2042–2054.
- Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., Sidransky, D., and Baylin, S.B. (1995). Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55, 4525–4530.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821–9826.
- Hermans, C., and Bernard, A. (1996). Clara cell protein (CC16): characteristics and potential applications as biomarker of lung toxicity. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 1, 3–8.
- Hou, L., Zhang, X., Tarantini, L., Nordio, F., Bonzini, M., Angelici, L., Marinelli, B., Rizzo, G., Cantone, L., Apostoli, P., et al. (2011). Ambient PM exposure and DNA methylation in tumor suppressor genes: a cross-sectional study. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 25.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., et al. (2013). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010. National Cancer Institute.
- Huang, H.-B., Lai, C.-H., Chen, G.-W., Lin, Y.-Y., Jaakkola, J.J.K., Liou, S.-H., and Wang, S.-L. (2012). Traffic-related air pollution and DNA damage: a longitudinal study in Taiwanese traffic conductors. *PloS One* 7, e37412.
- Huffman, J., Treutlein, B., and Pöschl, U. (2010). Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) in Central Europe. *Atmospheric Chem. Phys* 3215–3233.
- Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., and Raunio, H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol.* 32, 391–411.
- Hur, K., Cejas, P., Feliu, J., Moreno-Rubio, J., Burgos, E., Boland, C.R., and Goel, A. (2013). Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut*.
- Ian Freshney, R. (2011). Specialized Techniques - chapitre 27 - Lymphocyte Preparation. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition*.
- Ianovici, N., and Tudorica (2009). Aeromycoflora in outdoor environment of Timisoara city (Romania). *Not. Sci. Biol* 21–28.
- ILO (2013). International Labour Organization.
- INCa (2011). Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010.
- INSEE (2010). Recensement de la population 2010.

- IREP (2011). Registre Français des Emissions Polluantes (www.irep.ecologie.gouv.fr).
- Jacobs, J.J.L., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol. CB* *14*, 2302–2308.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* *33 Suppl*, 245–254.
- Jardim, M.J., Fry, R.C., Jaspers, I., Dailey, L., and Diaz-Sanchez, D. (2009). Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1745–1751.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer J. Clin.* *60*, 277–300.
- Ji, W., Yang, L., Yu, L., Yuan, J., Hu, D., Zhang, W., Yang, J., Pang, Y., Li, W., Lu, J., et al. (2008). Epigenetic silencing of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene in NiS-transformed cells. *Carcinogenesis* *29*, 1267–1275.
- Joseph, P., Klein-Szanto, A.J., and Jaiswal, A.K. (1998). Hydroquinones cause specific mutations and lead to cellular transformation and in vivo tumorigenesis. *Br. J. Cancer* *78*, 312–320.
- Joseph, P., Muchnok, T.K., Klishis, M.L., Roberts, J.R., Antonini, J.M., Whong, W.Z., and Ong, T. (2001). Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *61*, 295–303.
- Kaminsky, L.S., Kennedy, M.W., Adams, S.M., and Guengerich, F.P. (1981). Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry (Mosc.)* *20*, 7379–7384.
- Kanwal, R., and Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *109*, 598–605.
- Karaczyn, A.A., Golebiowski, F., and Kasprzak, K.S. (2006). Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A. *Exp. Cell Res.* *312*, 3252–3259.
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P., and Möller, L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* *188*, 112–118.
- Ke, Q., Davidson, T., Chen, H., Kluz, T., and Costa, M. (2006). Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride. *Carcinogenesis* *27*, 1481–1488.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* *149*, 43–50.
- Kerr, K.M. (2001). Pulmonary preinvasive neoplasia. *J. Clin. Pathol.* *54*, 257–271.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 376–385.
- Kim, C.S., and Kang, T.C. (1997). Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *155*, 899–905.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr, Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., et al. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* *540*, 153–163.
- Klech, and Pohl (1989). Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur. Respir. J.* *2*, 561–585.

- Knaapen, A.M., Borm, P.J.A., Albrecht, C., and Schins, R.P.F. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *109*, 799–809.
- Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Ochiai, A., Monden, Y., and Tangoku, A. (2006a). The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *53*, 295–302.
- Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Ochiai, A., Monden, Y., and Tangoku, A. (2006b). The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* *53*, 295–302.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2013). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *42*, D68–D73.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* *114*, 1299–1307.
- Lacoste, N., and Côté, J. (2005). Les résidus des histones sujets à des modifications post-traductionnelles chez les mammifères.
- Lantuejoul, S., Raynaud, C., Salameire, D., Gazzeri, S., Moro-Sibilot, D., Soria, J.-C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2010). Telomere maintenance and DNA damage responses during lung carcinogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2979–2988.
- Lantuéjoul, S., Salameire, D., Salon, C., and Brambilla, E. (2009). Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* *54*, 43–54.
- Latriano, L., Goldstein, B.D., and Witz, G. (1986). Formation of muconaldehyde, an open-ring metabolite of benzene, in mouse liver microsomes: an additional pathway for toxic metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 8356–8360.
- Lee, E.W., and D'Alonzo, G.E. (1993). Cigarette smoking, nicotine addiction, and its pharmacologic treatment. *Arch. Intern. Med.* *153*, 34–48.
- Legifrance 2010/1250 Décret n° 2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air.
- Lepers, C. (2013). Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire : recherche in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particuliers (PM2.5) industriels, urbains et ruraux.
- Lewis, J.L., Chinswangwatanakul, W., Zheng, B., Marley, S.B., Nguyen, D.X., Cross, N.C., Banerji, L., Glassford, J., Thomas, N.S., Goldman, J.M., et al. (2001). The influence of INK4 proteins on growth and self-renewal kinetics of hematopoietic progenitor cells. *Blood* *97*, 2604–2610.
- Li, D.W., and Kendrick, B. (1995). A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int. J. Biometeorol.* *39*, 74–80.
- Lin, J., Zeng, R.M., Li, R.N., and Cao, W.H. (2014). Aberrant DNA methylation of the P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphism and folate intake in gastric cancer. *Genet. Mol. Res. GMR* *13*, 2060–2068.
- Liu, Q., Liu, L., Zhao, Y., Zhang, J., Wang, D., Chen, J., He, Y., Wu, J., Zhang, Z., and Liu, Z. (2011). Hypoxia induces genomic DNA demethylation through the activation of HIF-1 α and transcriptional upregulation of MAT2A in hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* *10*, 1113–1123.

- Liu, Y., Lan, Q., Siegfried, J.M., Luketich, J.D., and Keohavong, P. (2006). Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia N. Y. N* 8, 46–51.
- Liu, Y., Lan, Q., Shen, M., Jin, J., Mumford, J., Ren, D., and Keohavong, P. (2008). Aberrant gene promoter methylation in sputum from individuals exposed to smoky coal emissions. *Anticancer Res.* 28, 2061–2066.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Loizou, J.I., Murr, R., Finkbeiner, M.G., Sawan, C., Wang, Z.-Q., and Herceg, Z. (2006). Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 696–701.
- De Lorenzo, A. (1970). The olfactory neuron and the blood-brain barrier In: Taste and smell in vertebrates. Wolstenholme G, Knight J, eds: J and A. Churchill 151–176.
- Lu, H., Ouyang, W., and Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer Res. MCR* 4, 221–233.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999). Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 119, 1–16.
- Malleter, M., Jacquot, C., Rousseau, B., Tomasoni, C., Juge, M., Pineau, A., Sakanian, V., and Roussakis, C. (2012). miRNAs, a potential target in the treatment of Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Gene* 506, 355–359.
- Masclet, P., and Cahier, H. (1998). L'aérosol atmosphérique. Caractéristiques physico-chimiques. *Analisis* 26, 11–17.
- Mass, M.J., and Wang, L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.* 386, 263–277.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88, 1515–1531.
- MEDDE (2013). Base des Installations Classées (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie).
- Meng, A., Wang, Y., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003). Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* 63, 5414–5419.
- Menzel, O., Migliaccio, M., Goldstein, D.R., Dahoun, S., Delorenzi, M., and Rufer, N. (2006). Mechanisms regulating the proliferative potential of human CD8+ T lymphocytes overexpressing telomerase. *J. Immunol. Baltim. Md* 177, 3657–3668.
- Mercer, B.A., Wallace, A.M., Brinckerhoff, C.E., and D'Armiento, J.M. (2009). Identification of a cigarette smoke-responsive region in the distal MMP-1 promoter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40, 4–12.
- Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1, 686–692.

- Metellus, P., Coulibaly, B., Nanni, I., Fina, F., Eudes, N., Giorgi, R., Barrie, M., Chinot, O., Fuentes, S., Dufour, H., et al. (2009). Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* *115*, 4783–4794.
- Miyamoto, K., and Ushijima, T. (2005). Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *35*, 293–301.
- Morlá, M., Busquets, X., Pons, J., Sauleda, J., MacNee, W., and Agustí, A.G.N. (2006). Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur. Respir. J.* *27*, 525–528.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8905–8909.
- Myöhänen, S.K., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* *58*, 591–593.
- Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* *22*, 1715–1719.
- Nakatsuru, Y., Tsuchiya, E., Nakagawa, K., Nemoto, N., Oda, H., and Ishikawa, T. (1994). O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in the human lung persists with advancing age. *Gerontology* *40 Suppl 2*, 3–9.
- National Human Genome Research (2008). Les différents niveaux de compaction de l'ADN.
- Nava, S., Becherini, F., Bernardi, A., Bonazza, A., Chiari, M., García-Orellana, I., Lucarelli, F., Ludwig, N., Migliori, A., Sabbioni, C., et al. (2010). An integrated approach to assess air pollution threats to cultural heritage in a semi-confined environment: the case study of Michelozzo's Courtyard in Florence (Italy). *Sci. Total Environ.* *408*, 1403–1413.
- Nebert, D.W., and Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 947–960.
- Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B. (2002). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* *105*, 411–414.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* *368*, 753–756.
- Novo, E., and Parola, M. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* *1*, 5.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A.C. (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5–74; disc. 75–86.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* *113*, 823–839.
- Ohnuki, Y., Reddel, R.R., Bates, S.E., Lehman, T.A., Lechner, J.F., and Harris, C.C. (1996). Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* *92*, 99–110.
- Olson, K.R. (1984). Carbon monoxide poisoning: mechanisms, presentation, and

- controversies in management. *J. Emerg. Med.* **1**, 233–243.
- OMS (2002). The world health report: reducing risk promoting healthy life (World Health Organization, Geneva, Switzerland).
- OMS (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks provides a comprehensive assessment of the mortality and burden of disease attributable to 24 global risk factors. (World Health Organization, Geneva, Switzerland).
- Osada, H., and Takahashi, T. (2002). Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* **21**, 7421–7434.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P., and Peters, G. (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* **15**, 495–503.
- Panani, A.D., and Roussos, C. (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett.* **239**, 1–9.
- Pavanello, S., Pesatori, A.-C., Dioni, L., Hoxha, M., Bollati, V., Siwinska, E., Mielżyńska, D., Bolognesi, C., Bertazzi, P.-A., and Baccarelli, A. (2010). Shorter telomere length in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **31**, 216–221.
- Pereg, D., Robertson, L.W., and Gupta, R.C. (2002). DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts derived from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites. *Chem. Biol. Interact.* **139**, 129–144.
- Pereira, B., and Ferreira, M.G. (2013). Sowing the seeds of cancer: telomeres and age-associated tumorigenesis. *Curr Opin Oncol* **25**, 93–98.
- Perrone, M.G., Gualtieri, M., Ferrero, L., Lo, P.C., Udisti, R., Bolzacchini, E., and Camatini, M. (2010). Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan. *Chemosphere* **78**, 1368–1377.
- Petersen, I. (2011). The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **108**, 525–531.
- Pilsner, J.R., Liu, X., Ahsan, H., Ilievski, V., Slavkovich, V., Levy, D., Factor-Litvak, P., Graziano, J.H., and Gamble, M.V. (2007). Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 1179–1186.
- Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V., and Weiss, S.J. (2000). Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J. Exp. Med.* **192**, 789–799.
- Putaud, J.-P., Dingenen, R.V., Alastuey, A., Bauer, H., Birmili, W., Cyrys, J., Flentje, H., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hansson, H.C., et al. (2010). A European aerosol phenomenology e 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmos. Environ.* **44**, 1308–1320.
- Raaschou-Nielsen, O., Vineis, P., Brunekreef, B., Nieuwenhuijsen, M., Hoffmann, B., Forastiere, F., Oudin, A., Hoek, G., Katsouyanni, K., Schwarze, P., et al. (2013). Air pollution and lung cancer in Europe – Authors’ reply. *Lancet Oncol.* **14**, e440.
- Rea, I.M., Stewart, M., Campbell, P., Alexander, H.D., Crockard, A.D., and Morris, T.C. (1996). Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age. *Gerontology* **42**, 69–78.
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., McMenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.B., Rhim, J.S., and Harris,

- C.C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* *48*, 1904–1909.
- Rink, L., Cakman, I., and Kirchner, H. (1998). Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* *102*, 199–209.
- Risom, L., Møller, P., and Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* *592*, 119–137.
- Rissler, J., Swietlicki, E., Bengtsson, A., Boman, C., Pagels, J., Sandström, T., Blomberg, A., and Löndahl, J. (2012). Experimental determination of deposition of diesel exhaust particles in the human respiratory tract. *J. Aerosol Sci.* *48*, 18–33.
- Rodriguez-Menocal, L., Pham, S.M., Mateu, D., St-Pierre, M., Wei, Y., Pestana, I., Aitouche, A., and Vazquez-Padron, R.I. (2010). Aging increases p16 INK4a expression in vascular smooth-muscle cells. *Biosci. Rep.* *30*, 11–18.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* *273*, 5858–5868.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* *146*, 905–916.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Lee, H.W., Blasco, M., Gottlieb, G.J., Greider, C., and DePinho, R.A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* *96*, 701–712.
- Rufer, N., Brümmendorf, T.H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M., and Lansdorp, P.M. (1999). Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J. Exp. Med.* *190*, 157–167.
- Rufer, N., Migliaccio, M., Antonchuk, J., Humphries, R.K., Roosnek, E., and Lansdorp, P.M. (2001). Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential. *Blood* *98*, 597–603.
- Russell, R.E.K., Culpitt, S.V., DeMatos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J., and Barnes, P.J. (2002). Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 602–609.
- Salvi, S., Blomberg, A., Rudell, B., Kelly, F., Sandström, T., Holgate, S.T., and Frew, A. (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *159*, 702–709.
- Sandig, V., Brand, K., Herwig, S., Lukas, J., Bartek, J., and Strauss, M. (1997). Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat. Med.* *3*, 313–319.
- Schnekenburger, M., Peng, L., and Puga, A. (2007). HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated transactivation. *Biochim. Biophys. Acta* *1769*, 569–578.
- Schwartz, A.G., Prysak, G.M., Bock, C.H., and Cote, M.L. (2007). The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* *28*, 507–518.
- Seinfeld, J.H., and Pandis, S.N. (2006). *Atmospheric Chemistry and Physics - From Air Pollution to Climate Change* (2nd Edition).

- Sekido, Y., Fong, K.M., and Minna, J.D. (2003). Molecular genetics of lung cancer. *Annu. Rev. Med.* *54*, 73–87.
- SFH (2010). Hémogramme : indications et interprétations. In Société Française d'Hématologie,.
- Shen, J., and Yakel, J.L. (2009). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol. Sin.* *30*, 673–680.
- Shields, P.G. (2002). Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene* *21*, 6870–6876.
- Shigematsu, H., and Gazdar, A.F. (2006). Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer* *118*, 257–262.
- Shih, C.-M., Ko, W.-C., Wu, J.-S., Wei, Y.-H., Wang, L.-F., Chang, E.-E., Lo, T.-Y., Cheng, H.-H., and Chen, C.-T. (2004). Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* *91*, 384–397.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *21*, 257–276.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., and Halbrook, R.S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal.* *12*, 353–360.
- Siems, W.G., Grune, T., and Esterbauer, H. (1995). 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Life Sci.* *57*, 785–789.
- Silverman, D.T., Samanic, C.M., Lubin, J.H., Blair, A.E., Stewart, P.A., Vermeulen, R., Coble, J.B., Rothman, N., Schleiff, P.L., Travis, W.D., et al. (2012). The Diesel Exhaust in Miners Study: A Nested Case–Control Study of Lung Cancer and Diesel Exhaust. *J. Natl. Cancer Inst.*
- Smith, C.J., and Hansch, C. (2000). The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *38*, 637–646.
- Snyder, R., and Hedli, C.C. (1996). An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.* *104 Suppl 6*, 1165–1171.
- Soberanes, S., Gonzalez, A., Urich, D., Chiarella, S.E., Radigan, K.A., Osornio-Vargas, A., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Ridge, K.M., Chandel, N.S., et al. (2012). Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Sci. Rep.* *2*, 275.
- Song, B., Ai, J., Kong, X., Liu, D., and Li, J. (2013a). Aberrant DNA Methylation of P16, MGMT, and hMLH1 Genes in Combination with MTHFR C677T Genetic Polymorphism in gastric cancer. *Pak. J. Med. Sci.* *29*, 1338–1343.
- Song, E.Q., Ma, X.Y., Tian, X.G., Liu, J., Liu, L.C., Dong, H., and Song, Y. (2013b). The effect of the structure of polychlorinated biphenyls on their hydroxylation, oxidation, and glutathionyl conjugation reactions. *Biomed. Environ. Sci. BES* *26*, 138–147.
- Souliotis, V.L., Boussiatis, V.A., Pangalis, G.A., and Kyrtopoulos, S.A. (1991). In vivo formation and repair of O6-methylguanine in human leukocyte DNA after intravenous exposure to dacarbazine. *Carcinogenesis* *12*, 285–288.
- Spivack, S.D., Hurteau, G.J., Fasco, M.J., and Kaminsky, L.S. (2003). Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 6002–6011.

- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* *11*, 1105–1112.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* *123*, 1133–1146.
- Stohl, A., and al. (2007). Arctic smoke – record high air pollution levels in the European Arctic due to agricultural fires in Eastern Europe in spring 2006. *Atmospheric Chem. Phys.* *7*, 511–534.
- Su, S., Jin, Y., Zhang, W., Yang, L., Shen, Y., Cao, Y., and Tong, J. (2006). Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine. *J. Occup. Health* *48*, 261–266.
- Sun, L.-Q., Lee, D.W., Zhang, Q., Xiao, W., Raabe, E.H., Meeker, A., Miao, D., Huso, D.L., and Arceci, R.J. (2004). Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev.* *18*, 1035–1046.
- Suter, M., Abramovici, A., Showalter, L., Hu, M., Shope, C.D., Varner, M., and Aagaard-Tillery, K. (2010). In utero tobacco exposure epigenetically modifies placental CYP1A1 expression. *Metabolism.* *59*, 1481–1490.
- Takiguchi, M., Achanzar, W.E., Qu, W., Li, G., and Waalkes, M.P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.* *286*, 355–365.
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M., and Nakamura, K.-I. (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp. Gerontol.* *37*, 523–531.
- Testa, J.R., Liu, Z., Feder, M., Bell, D.W., Balsara, B., Cheng, J.Q., and Taguchi, T. (1997). Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *95*, 20–32.
- Teubner, W., Meinel, W., and Glatt, H. (2002). Stable expression of rat sulfotransferase 1B1 in V79 cells: activation of benzylic alcohols to mutagens. *Carcinogenesis* *23*, 1877–1884.
- Thorpe, A., Harrison, R., Boulter, P., and McCrae, I. (2007). Estimation of particle resuspension source strength on a major London Road. *Atmos. Environ.* *41*, 8007–8020.
- Travis, W., Brambilla, E., and Müller-Hermeling, K. (2004). World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Harris CC, IARC.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Van Schil, P.E., et al. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *6*, 244–285.
- Université Pierre et Marie Curie (2009). *Serveur d'images d'histologie.*
- Val, S., Liouise, C., Doumbia, E.H.T., Galy-Lacaux, C., Cachier, H., Marchand, N., Badel, A., Gardrat, E., Sylvestre, A., and Baeza-Squiban, A. (2013). Physico-chemical characterization of African urban aerosols (Bamako in Mali and Dakar in Senegal) and their toxic effects in human bronchial epithelial cells: description of a worrying situation. *Part. Fibre Toxicol.* *10*, 10.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., and Vlachogianni, T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological

- assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* *26*, 339–362.
- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., and Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* *366*, 662–664.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* *160*, 1–40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 44–84.
- Vattanasit, U., Navasumrit, P., Khadka, M.B., Kanitwithayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H., and Ruchirawat, M. (2014). Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *217*, 23–33.
- Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol. CB* *8*, 279–282.
- Vesterinen, E., Pukkala, E., Timonen, T., and Aromaa, A. (1993). Cancer incidence among 78,000 asthmatic patients. *Int. J. Epidemiol.* *22*, 976–982.
- Di Vinci, A., Gelvi, I., Banelli, B., Casciano, I., Allemanni, G., and Romani, M. (2006). Meth-DOP-PCR: an assay for the methylation profiling of trace amounts of DNA extracted from bodily fluids. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *86*, 297–303.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* *192*, 95–117.
- Wallaert, B., De Vuyst, P., and Israel-Biet, D. (1992). [Broncho-alveolar lavage. From technical aspects to standards of interpretation]. *Rev. Mal. Respir.* *9*, 39–56.
- Walter, C.A., Zhou, Z.Q., Manguino, D., Ikeno, Y., Reddick, R., Nelson, J., Intano, G., Herbert, D.C., McMahan, C.A., and Hanes, M. (2001). Health span and life span in transgenic mice with modulated DNA repair. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *928*, 132–140.
- Wang, T., Garcia, J.G., and Zhang, W. (2012). Epigenetic Regulation in Particulate Matter-Mediated Cardiopulmonary Toxicities: A Systems Biology Perspective. *Curr. Pharmacogenomics Pers. Med.* *10*, 314–321.
- Warner, N.A., Martin, J.W., and Wong, C.S. (2009). Chiral polychlorinated biphenyls are biotransformed enantioselectively by mammalian cytochrome P-450 isozymes to form hydroxylated metabolites. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 114–121.
- Weinberg, R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* *254*, 1138–1146.
- Weng, N.P., Palmer, L.D., Levine, B.L., Lane, H.C., June, C.H., and Hodes, R.J. (1997). Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immunol. Rev.* *160*, 43–54.
- Weng, N.P., Hathcock, K.S., and Hodes, R.J. (1998). Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* *9*, 151–157.
- Whang-Peng, J., Kao-Shan, C.S., Lee, E.C., Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (1982). Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer; deletion 3p(14-23). *Science* *215*, 181–182.

- Whitby, K., and Cantrell, B. (1976). *Atmospheric Aerosols: Characteristics and Measurement*. Las Vegas.
- Wikipédia (2014). Appareil respiratoire.
- Williams, M.D., and Sandler, A.B. (2001). The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat. Res.* 105, 31–52.
- Wu, K.D., and Hansen, E.R. (2001). Shortened telomere length is demonstrated in T-cell subsets together with a pronounced increased telomerase activity in CD4 positive T cells from blood of patients with mycosis fungoides and parapsoriasis. *Exp. Dermatol.* 10, 329–336.
- Wu, J.-Y., Wang, J., Lai, J.-C., Cheng, Y.-W., Yeh, K.-T., Wu, T.-C., Chen, C.-Y., and Lee, H. (2008). Association of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation with p53 mutation occurrence in non-small cell lung cancer with different histology, gender, and smoking status. *Ann. Surg. Oncol.* 15, 3272–3277.
- Wyatt, H.D.M., West, S.C., and Beattie, T.L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 38, 5609–5622.
- Wynder, E., and Graham, E. (1950). Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J. Am. Med. Assoc.* 143, 329–336.
- Xu, C., Li, C.Y.-T., and Kong, A.-N.T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 28, 249–268.
- Yancik, R. (1997). Cancer burden in the aged: an epidemiologic and demographic overview. *Cancer* 80, 1273–1283.
- Yasuda, S., Idell, S., Fu, J., Carter, G., Snow, R., and Liu, M.-C. (2007). Cigarette smoke toxicants as substrates and inhibitors for human cytosolic SULTs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221, 13–20.
- Yin, A., Zhang, L., Cheng, J., Dong, Y., Liu, B., Han, N., and Zhang, X. (2014). The predictive but not prognostic value of MGMT promoter methylation status in elderly glioblastoma patients: a meta-analysis. *PLoS One* 9, e85102.
- Yokota, J., and Kohno, T. (2004). Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 95, 197–204.
- Young, N.S. (2010). Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2010, 30–35.
- Yu, N.-K., Baek, S.H., and Kaang, B.-K. (2011). DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Mol. Brain* 4, 5.
- Zhang, A.-H., Bin, H.-H., Pan, X.-L., and Xi, X.-G. (2007). Analysis of p16 gene mutation, deletion and methylation in patients with arseniasis produced by indoor unventilated-stove coal usage in Guizhou, China. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 970–975.
- Zhang, Q., Kusaka, Y., Zhu, X., Sato, K., Mo, Y., Kluz, T., and Donaldson, K. (2003). Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *J. Occup. Health* 45, 23–30.
- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P., and Waalkes, M.P. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10907–10912.
- Zhong, C.X., and Mass, M.J. (2001). Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicol. Lett.* 122, 223–234.
- Zhou, X., Sun, H., Ellen, T.P., Chen, H., and Costa, M. (2008). Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis* 29, 1831–1836.

Zhou, X., Li, Q., Arita, A., Sun, H., and Costa, M. (2009). Effects of nickel, chromate, and arsenite on histone 3 lysine methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *236*, 78–84.

Zochbauer-Muller, S., Fong, K.M., Virmani, A.K., Geradts, J., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* *61*, 249–255.

ANNEXE

Annexe 1 : Formulaire de consentement éclairé

- ETUDE AEROTOX-
Pollution atmosphérique particulaire:
Etudes des altérations biologiques cancérogènes sur un modèle de co-
culture de macrophages alvéolaires et de cellules épithéliales
pulmonaires humaines

Protocole : AEROTOX

Numéro Protocole : 2011-RC-CB02

Promoteur : GHICL

Investigateur principal : Pr Pierre GOSSET

Je soussigné(e) :

Nom :.....**Prénom :**.....

Adresse :.....

Atteste par le présent consentement que :

- Je suis affilié(e) ou bénéficiaire d'un régime de sécurité sociale ;
- J'ai pris connaissance de la note d'information m'expliquant la nature, les objectifs et la durée du protocole de recherche mentionné ci-dessus ;
- J'ai pu poser toutes les questions que je voulais, j'ai reçu des réponses adaptées et j'ai pu disposer d'un temps de réflexion suffisant entre l'information et ma décision de participer à cette étude ;
- Il m'a été donné le nom d'une personne à contacter pour toute question que je souhaiterai poser durant l'étude ;
- J'ai bien noté que je serai libre à tout moment d'arrêter ma participation sans aucune conséquence pour le niveau de soins que je recevrai.

Compte-tenu des informations qui m'ont été transmises :

J'accepte librement et volontairement de participer à ce protocole de recherche. ^(a)

(a) loi n° 2004-801 du 6/08/2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et modifiant la loi n° 78-17 du 6/01/1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi "Informatique & Libertés" s'exerce à tout moment auprès du médecin en charge de la recherche, qui seul connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès du Dr..... qui contactera le promoteur de la recherche.

J'accepte que les échantillons soient conservés pendant 5 ans pour des études ultérieures au sein du service d'Anatomopathologie de l'hôpital Saint Vincent de Paul en fonction de l'avancement des connaissances.

OUI

NON

<i>Patient</i>	<i>Personne responsable du recueil du consentement éclairé</i>
Nom :.....	Nom :.....
Prénom :.....	Prénom :.....
Date :.....	Date :.....
Signature (avec la mention : lu, compris et approuvé) :	Signature :

Donner un exemplaire de la lettre d'information et du formulaire de consentement éclairé signé au patient, et conserver un autre exemplaire signé (lettre d'information et formulaire de consentement éclairé).

- Une assurance a été souscrite, conformément à la législation en vigueur, auprès de la Mutuelle Saint-Christophe, dont le n° de contrat est le n°3.348.487.104, et auprès de la Société Axa, dont le n° de contrat est le n°3002505004.
- Déclaration CNIL normale (article 23 de la loi du 6/01/78 modifiée) pour le GHICL enregistrée le 21/04/2011 au numéro d'enregistrement 1501871.

Titre : Influence de l'âge et du tabac sur les mécanismes génotoxiques et épigénétiques précoces de cancérogenèse broncho-pulmonaire en réponse à la pollution particulaire urbaine

Résumé :

Récemment reconnus comme cancérogènes certains pour l'homme par l'IARC, la pollution atmosphérique et les particules fines (PM_{2.5}) peuvent être inhalées et pourraient être retenues au niveau pulmonaire ou passer dans la circulation systémique. Ceci peut causer ou renforcer de nombreuses pathologies auxquelles les personnes âgées sont souvent plus sensibles. Cette thèse s'inscrit dans une démarche d'identification des processus impliqués dans la modulation du potentiel cancérogène des PM_{2.5}, en lien avec l'âge ou le statut tabagique. Les particules ont été collectées à Dunkerque, agglomération présentant des influences maritimes mais également caractérisée par des activités industrielles et un trafic automobile importants.

Pour évaluer l'influence de l'âge, des lymphocytes sanguins prélevés chez 90 patients issus de trois classes d'âge (25-30, 50-55 et 75-80 ans) ont été exposés *ex vivo* à des PM_{2.5} d'origine urbaine. Les lymphocytes isolés ont été exposés aux PM_{2.5} pendant 72 heures, avant de mesurer l'activité télomérase et la modulation d'expression de gènes tels que *P16^{INK4A}* et *MGMT*. Les PM_{2.5} entraînent des variations de l'activité télomérase et de la longueur des télomères dans toutes les tranches d'âge indifféremment. L'expression du gène *P16^{INK4A}* est significativement augmentée avec l'âge après exposition aux PM_{2.5}. L'âge augmenterait l'expression du gène *MGMT* après exposition aux particules, en diminuant le niveau de méthylation de son promoteur uniquement dans le groupe des patients les plus âgés.

Concernant le rôle du statut tabagique, 26 lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés chez des patients fumeurs et non-fumeurs. Les macrophages issus de ces prélèvements ont été mis en culture avec des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, avant exposition aux PM_{2.5} (3 et 15 µg/cm², 72 h). L'activité télomérase et la longueur des télomères varient après exposition aux PM_{2.5} et le statut tabagique modifie ces paramètres dans les cellules BEAS-2B et les macrophages alvéolaires. La méthylation des promoteurs et l'expression des gènes *P16^{INK4A}* et *MGMT* ne sont pas modifiées dans les cellules BEAS-2B, alors que dans les macrophages alvéolaires les particules induisent l'expression de ces gènes par une diminution de la méthylation de leurs promoteurs. Le statut tabagique fumeur semble au contraire accroître la méthylation et limite l'expression de ces deux gènes.

En conclusion, il apparaît que l'échantillon de PM_{2.5} étudié peut induire *ex vivo* plusieurs lésions décrites dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse broncho-pulmonaire. L'âge et le tabagisme sont susceptibles de moduler les effets toxiques des particules. Alors que les symptômes du cancer du poumon apparaissent seulement à une étape avancée de la maladie, nos résultats pourraient aider à la découverte de nouveaux marqueurs de diagnostic précoce permettant ainsi d'améliorer la survie.

Mots-clés : pollution atmosphérique ; PM_{2.5} ; âge ; tabagisme ; lymphocytes ; macrophages alvéolaires, lignée BEAS-2B ; co-culture ; génotoxicité ; épigénétique.

Title: Role of aging and smoking in the modulation of genotoxic and epigenetic events of carcinogenesis after exposure to air pollution particulate matter

Abstract:

Recently recognized as carcinogenic to human by IARC, air pollution and fine particulate matter (PM_{2.5}) can be inhaled and could be retained into the lung or reach the systemic circulation. This can cause or worsen many diseases for which the elderly are often more sensitive. The PhD objective corresponds to the identification of the mechanisms of action involved in the modulation of carcinogenic potential of PM_{2.5}, in connection with age or smoking status. PM_{2.5} were collected in Dunkerque, a French seaside city characterized by important industrial activities and heavy motor vehicle traffic.

In order to estimate the influence of age, blood lymphocytes sampled from 90 patients from age classes (25-30, 50-55 and 75-80 years old) were *ex vivo* exposed to PM_{2.5} during 72 hours, before evaluation of telomerase activity and gene expression modulation of *P16^{INK4A}* and *MGMT*. PM_{2.5} modulated telomerase activity and telomeres length in all age groups without any influence of age. *P16^{INK4A}* gene expression increased significantly with age after exposure to PM_{2.5}. Age could enhance *MGMT* gene expression after exposure to particles by decreasing the level of promoter methylation in the oldest group.

Regarding the role of smoking status, 26 broncho-alveolar lavage were performed in smoker and non-smoker people. Macrophages were cultured with bronchial epithelial BEAS-2B cells before PM_{2.5} exposure (3 or 15µg/cm²; 72h). The telomerase activity and telomere length vary after exposure and the tobacco modify these parameters in BEAS-2B cells and alveolar macrophages. Methylation of *P16^{INK4A}* and *MGMT* genes promoters and their expression are not modified in BEAS-2B cells. In alveolar macrophages, particles lead to a decrease of methylation of *P16^{INK4A}* gene promoter. The smoking status seems also to increase methylation and to down-regulate expression of these two genes.

In conclusion, it seems that the studied PM_{2.5} sample can induce *ex vivo* modifications described in the initiation and promotion of lung carcinogenesis. The age and smoking status may modulate the toxic effects of particles. Since lung cancer symptoms appear only at an advanced stage, our results could help in proposing new biomarkers of carcinogenesis allowing an early diagnosis to improve survival.

Keywords: air pollution; PM_{2.5}; aging; smoking; lymphocytes; alveolar macrophages; BEAS-2B cell line; co-culture; genotoxicity ; epigenetic.

Discipline : Toxicologie

Laboratoire : UCEIV EA4492 Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant ; Université du Littoral Côte d'Opale ; MREI 2, 189A, av. M. Schumann, 59140 Dunkerque, France.

Direction de thèse : Pr François SICHEL & Dr Sylvain BILLET