



HAL
open science

Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire : recherche in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particuliers (PM .) industriels, urbains et ruraux

Capucine Lepers

► **To cite this version:**

Capucine Lepers. Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire : recherche in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particuliers (PM .) industriels, urbains et ruraux. Sciences agricoles. Université du Littoral Côte d'Opale, 2013. Français. NNT : 2013DUNK0352 . tel-01334649

HAL Id: tel-01334649

<https://theses.hal.science/tel-01334649>

Submitted on 21 Jun 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**

Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire : recherche
in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols
atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) industriels, urbains et ruraux

Présentée par :

Capucine LEPERS

le 30 octobre 2013

Réalisée sous la direction de Monsieur le **Professeur Pirouz SHIRALI**
et de Monsieur le **Docteur Sylvain BILLET**

COMPOSITION DU JURY :

Pierre GOSSET	Professeur Agrégé, Faculté Libre de Médecine de Lille	Président
Armelle BAEZA	Professeur, Université Paris Diderot - Paris VII	Rapporteur
Laurence VIAN	Professeur, Université de Montpellier 1	Rapporteur
Marc PALLARDY	Professeur, Université Paris Sud - Paris XI	Examineur
François SICHEL	Professeur, Université de Caen - Basse-Normandie	Examineur
Sylvain BILLET	Maître de Conférences, Université du Littoral Côte d'Opale	Co-directeur

Au Professeur Pirouz Shirali

*A ma famille, Corinne et Claude, Adeline,
Benjamine et Gauthier, Emmanuelle.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Mesdames les Professeurs Armelle BAEZA et Laurence VIAN, d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit, et Messieurs les Professeurs Marc PALLARDY et François SICHEL, d'être examinateurs de ce travail. A François, un merci sincère pour ta présence dans ces moments difficiles ; merci aussi pour ton implication dans nos collaborations. Je remercie Monsieur le Professeur Pierre GOSSET, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse. C'est grâce à vous que j'ai découvert le laboratoire il y a sept ans. J'espère que vous apprécierez le chemin parcouru. Merci pour votre disponibilité et nos échanges lors de mes passages à Saint-Vincent.

Je tiens également à remercier les personnes avec lesquelles j'ai collaboré au cours de ce travail. Merci au Docteur Véronique ANDRE de l'Université de Caen Basse-Normandie pour la réalisation du post-marquage, pour ses conseils et son aide lors de mes séjours à Caen, et pour son implication dans l'écriture de nos publications communes. Je remercie aussi le Docteur Eric DEHECQ, du Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille, de nous avoir apporté son expertise dans la caractérisation de la fraction biologique. Merci à tous les membres du Centre Commun de Mesures de l'ULCO pour la collecte et la caractérisation des PM_{2.5}, ainsi que pour leur disponibilité et leur accessibilité. Merci enfin au Professeur Dominique COURCOT, Directeur de l'équipe « chimie et toxicologie des émissions atmosphériques » de l'UCEIV, tout d'abord pour l'analyse en MEB des particules, mais surtout pour sa présence et son implication dans notre Unité en cette période.

Au Professeur SHIRALI, quelques mots que j'aurais aimé pouvoir vous dire... J'espère qu'ils permettront d'imaginer le Directeur que vous avez été. Dès notre première rencontre en mars 2006, j'ai été saisie par votre écoute et votre gentillesse. Vous saviez vous rendre disponible malgré un emploi du temps bien chargé, vous prêtiez une attention particulière à chacun d'entre nous et, surtout, vous vouliez donner sa chance à chaque jeune. Vous m'avez accordé votre confiance tout au long de ces années, où vous m'avez accompagnée dans ma formation scientifique et humaine. Aujourd'hui le « petit poussin », pour reprendre votre formule, a grandi et s'apprête à franchir cette dernière étape de la thèse. J'espère que vous auriez été fier du résultat. Merci « Chef ».

Sylvain, Docteur BILLET, j'ai de nombreuses raisons de te remercier aujourd'hui. Merci d'avoir accepté de co-encadrer ce travail de thèse et la charge de travail qui va avec. Merci pour tes conseils, ta confiance et ton soutien. Merci pour les nuits blanches passées à relire et à « ripoliner » ma prose. Sache que j'ai appris énormément avec toi au cours de ces années. D'un point de vue plus personnel, merci de ne pas avoir mis à la porte dès le

premier jour une stagiaire ayant l'outrecuidance de monopoliser ton ordinateur. Ta bonne humeur, tes blagues légendaires et tes jeux de mots extraordinaires ont égayé mes années au laboratoire. Merci pour ton amitié.

Merci à Anthony VERDIN, indispensable au laboratoire, sur qui j'ai toujours pu compter. Merci pour ton aide pour les manips, la paperasse, les commandes et tout le reste, pour ta disponibilité et tes encouragements. J'espère que nous partagerons encore de nombreux fous rires et paquets de M&M's. Merci à Perrine MARTIN. Ton arrivée chez nous a été une belle rencontre scientifique et humaine. Tu t'es toujours montrée disponible et prête à rendre service, et en plus tu cites la Cité de la Peur. C'est un plaisir de travailler avec toi !

Merci également à tous ceux qui ont passé un moment au laboratoire ces dernières années, trop nombreux pour tous les citer, mais qui m'ont beaucoup appris et qui ont su à leur manière contribuer à l'ambiance du laboratoire ; tous mes encouragements à Boris et Mireille, vous êtes proches du but ! Un merci spécial à Lucie qui ne se laisse pas décourager par huit heures de manip, qui m'a initiée aux jeux de rôle et à qui le trajet Grenoble - Lille (Dunkerque) ne fait pas peur, ainsi qu'à Bertrand qui maintient notre glycémie matinale et donne un ton inimitable à nos pauses de midi.

Merci aux membres de l'UCEIV et de la MREID, nombreux sont ceux qui m'ont accompagnée au long de ce parcours et qui, par leur gentillesse et leur bonne humeur, ont rempli ces années de bons moments. Des mercis particuliers à Ophélie et à Francine CAZIER, mais aussi à tous les autres !!!

Merci à mes Amis de longue date : Amélie, Charlotte, Max et Thony, pour leur affection, leur soutien moral, et d'être là pour moi même si je ne suis pas toujours très disponible.

J'ai une pensée spéciale pour ma Marraine Yveline et sa grande famille, sur qui j'ai toujours pu compter.

Enfin, merci à ma Famille pour leur soutien indéfectible, leur amour et leur présence. Maman, Kiki & Virginie, Bugs, Gauthier & Solène, Mamie, Emmanuelle, merci d'être là, tout simplement...

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 le Vivant (UCEIV, EA4492), qui m'ont accueillie dans leur structure



- de la Région Nord - Pas de Calais et du Syndicat Mixte de la Côte d'Opale, qui ont financé mon doctorat (allocation n°2010-09206)



- des partenaires qui ont financé ces travaux de recherche :
 - o l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, convention n° EST-2007-48) ;
 - o l'Institut National du Cancer (INCa, convention n° 2010-368) ;
 - o 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 :

1. Dergham M., Lepers C., Verdin A., Billet S., Cazier F., Courcot D., Shirali P., Garçon G. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural-, urban-, or industrial-surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25(4):904-19. (IF 2012 = 3,779)
2. Lepers C., André V., Dergham M., Billet S., Verdin A., Garçon G., Dewaele D., Cazier F., Sichel F., Shirali P. Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA-adducts generated by particulate matter pollutions: geographical and seasonal influence. *Journal of Applied Toxicology (accepté)*. (IF 2012 = 2,478)

- Actes dans des congrès internationaux :

3. Billet S., Lepers C., Garçon G., Dergham M., André V., Verdin A., Sichel F., Shirali P. Genotoxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) depending on its origin and sampling season. *Toxicology Letters*, 205:S103, 2011. (IF 2012 = 3,230)
4. Garçon G., Dergham M., Billet S., Lepers C., Verdin A., Courcot D., Cazier F., Shirali P. Comparative toxicity of air pollution particulate matter (PM_{2.5}) sampled under urban, industrial or rural influence in human bronchial epithelial lung cells (BEAS-2B). *Toxicology Letters*, 205:S53, 2011. (IF 2012 = 3,230)
5. 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. Publication dans une revue scientifique nationale à comité de lecture :

- Article original de recherche :

6. Lepers C., Billet S., Dergham M., Gosset P., Verdin A., Garçon G., Pottier D., André V., Shirali P., Sichel F. Génotoxicité comparée de particules atmosphériques en fonction de leur origine industrielle, urbaine et rurale. *Pollution Atmosphérique [en ligne]*, n°217, mis à jour le 22/04/2013.

III. Publications soumises à des revues scientifiques internationales à comité de lecture ou en préparation :

- Articles soumis :

7. Dergham M., Lepers C., Verdin A., Billet S., Cazier F., Courcot D., Shirali P., Garçon G. Season-linked physicochemistry and toxicity of air pollution PM_{2.5-0.3} produced in rural-, urban-, or industrial-surroundings. (*soumis à Environmental Science and Technology*). (IF 2012 = 5,228)

8. Lepers C., Dergham M., Armand L., Billet S., Verdin A., André V., Pottier D., Courcot D., Shirali P., Sichel F. Mutagenicity and genotoxicity of native airborne particulate matter collected under industrial, rural or urban influence. (*soumis à Toxicology in Vitro*). (IF 2012 = 2,775)

- Article en préparation :

9. Lepers C., Billet S., Armand L., Martin P.J., Cazier F., Verdin A., Sichel F., Shirali P. Epigenetic toxicity of airborne pollutants: *in vitro* comparative study of six PM_{2.5} samples.

IV. Communications lors de congrès internationaux :

- Communications orales :

10. 47th Congress of the European Societies of Toxicology - Paris 28-31/08/2011

« Comparative toxicity of air pollution particulate matter (PM_{2.5}) sampled under urban, industrial or rural influence in human bronchial epithelial lung cells (BEAS-2B) »

Garçon G., Dergham M., Billet S., Lepers C., Verdin A., Courcot D., Cazier F., Shirali P.

11. 20th Congress of the International Association of Gerontology and Geriatrics - Séoul, Corée du Sud 23-27/06/2013

« Genotoxic and epigenetic modifications in blood lymphocytes exposed *in vitro* to urban air pollution particulate matter: influence of age »

Fougère B., Billet S., Lepers C., Martin P., Armand L., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

12. German-French DNA Repair Meeting - Illkirch 07-10/10/2013 (*accepté*)

« Epigenetic toxicity of airborne pollutants: *in vitro* comparative study of six PM_{2.5} samples »

Lepers C., Billet S., Armand L., Martin P.J., Cazier F., Verdin A., Sichel F., Shirali P.

- Session Poster-Discussion :

13. American Thoracic Society International Conference - Philadelphie, USA 17-22/05/2013

« Particulate matter samples from various origins induce different genotoxic effects and epigenetic modifications in bronchial epithelial cells »

Lepers C., Armand L., Verdin A., Martin P.J., Fougère B., Dewaele D., Cazier F., Billet S., Shirali P.

- Communications affichées :

14. 10th International Conference on Environmental Mutagens - Florence, Italie 21-25/08/2009

« Genotoxicity of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5}): determination of the tumour suppressor gene TP53 mutation pattern, using the FASAY »

Billet S., Paget V., Garçon G., Heutte N., Verdin A., Lepers C., Sichel F., Shirali P.

15. 7th GUM ³²P-Postlabelling Workshop - Münster Allemagne 28-29/03/2011

« Bulky DNA adducts formation on BEAS-2B cells exposed to PM_{2.5} from industrial, urban or rural areas: a comparative study »

André V., Lepers C., Le Goff J., Billet S., Sichel F., Shirali P., Garçon G.

16. *47th Congress of the European Societies of Toxicology - Paris 28-31/08/2011*
« Genotoxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) depending on its origin and sampling season »
Billet S., Lepers C., Garçon G., Dergham M., André V., Verdin A., Sichel F., Shirali P.
17. *2nd Congress of the International Society for Extracellular Vesicles - Boston, USA 17-20/04/2013*
« Impact of human BALF exosomes on bronchial epithelial cells: smokers vs non-smokers »
Martin P.J., Lepers C., Hille M., Verdin A., Firmin S., Roy Saint-Georges F., Billet S., Shirali P.
18. *German-French DNA Repair Meeting - Illkirch 07-10/10/2013 (soumis)*
« Mutagenicity and genotoxicity of native airborne particulate matter collected under industrial, urban or rural influence »
Lepers C., André V., Billet S., Armand L., Verdin A., Courcot D., Shirali P., Sichel F.
19. *International Society of Geriatric Oncology - Copenhagen, Danemark 24-26/10/2013 (accepté)*
« Role of aging in the modulation of early events of carcinogenesis after exposure *in vitro* to urban pollution particulate matter »
Fougère B., Billet S., Lepers C., Martin P.J., Armand L., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

V. Communications lors de congrès nationaux :

- Communications orales :

20. *Rencontres scientifiques de l'ANSES, Paris 10/05/2011*
« Evaluation de l'impact toxicologique de la pollution particulaire (PM_{2.5}) à Dunkerque : Etude sous influence industrielle, non-industrielle et rurale. 2^{ème} partie : Approche toxicologique *in vitro* »
Garçon G., Billet S., Dergham M., Lepers C., André V., Verdin A., Le Goff J., Cazier F., Courcot D., Sichel F., Shirali P.
21. *7^{èmes} Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air - Villeneuve d'Ascq 02-03/02/2012*
« Génotoxicité comparée de particules atmosphériques PM_{2.5} en fonction de leur origine industrielle, urbaine ou rurale »
Lepers C., Billet S., Dergham M., Gosset P., Verdin A., Garçon G., André V., Shirali P., Sichel F.
22. *7^{èmes} Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air - Villeneuve d'Ascq 02-03/02/2012*
« Effets *in vitro* de particules fines (PM_{2.5}) d'origines industrielles, urbaines, et rurales sur les cellules BEAS-2B : induction du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire »
Dergham M., Billet S., Lepers C., Verdin A., Dewaele D., Garçon G., Courcot, D., Shirali P.
23. *32^{èmes} Journées de la Société Française de Gériatrie et Gérontologie - La Défense 02-03/10/2012*
« Influence de l'âge sur la réponse de lymphocytes sanguins exposés *in vitro* à la pollution atmosphérique particulaire urbaine »
Fougère B., Billet S., Lepers C., Armand L., Martin P.J., Verdin A., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Gosset P., Shirali P.
24. *Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire - Chatenay-Malabry 06-07/06/2013*
« Toxicité épigénétique et pollution atmosphérique : étude comparative *in vitro* de six échantillons de PM_{2.5} »
Lepers C., Armand L., Martin P.J., Cazier F., Verdin A., Billet S., Shirali P.

- Communications affichées :

25. 6^{èmes} Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air - Villeneuve d'Ascq 04-05/02/2010
« Expression génique de protéines de la métabolisation des xénobiotiques dans des cellules épithéliales bronchiques humaines en primo-culture exposées à un aérosol particulaire »
Lepers C., Leclerc J., Billet S., Lo-Guidice J-M., Gosset P., Shirali P., Garçon G.

26. Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie - Paris 25-26/11/2010
« Évaluation du potentiel génotoxique d'aérosols atmosphériques PM_{2.5} issus d'influences distinctes »
Lepers C., Billet S., André V., Verdin A., Cazier F., Courcot D., Sichel F., Shirali P., Garçon G.

Prix du meilleur poster

27. 44^{èmes} Journées de la Société de Gériatrie de l'Ouest et du Centre - Tours, 25-26/05/2012
« Influence de l'âge sur les conséquences épigénétiques de l'exposition aux particules atmosphériques urbaines »
Fougère B., Billet S., Lepers C., Armand L., Bulckaen H., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

28. 45^{èmes} Journées de la Société de Gériatrie de l'Ouest et du Centre - La Rochelle, 07/06/2013
« Modifications génotoxiques et épigénétiques des lymphocytes sanguins exposés *in vitro* à la pollution atmosphérique particulaire urbaine : Influence de l'âge »
Fougère B., Billet S., Lepers C., Martin P., Armand L., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

29. 33^{èmes} Journées de la Société Française de Gériatrie et Gériatrie - Paris 08/10/2013 (soumis)
« Effet du vieillissement sur les modifications génotoxiques et épigénétiques induites par l'exposition *in vitro* à des particules atmosphériques urbaines »
Fougère B., Billet S., Lepers C., Martin P.J., Armand L., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

VI. Journées scientifiques locales ou régionales :

- Communication orale :

30. Journée Scientifique de l'UFR de Pharmacie - Université de Caen Basse-Normandie 04/11/2010
« Évaluation du potentiel génotoxique de particules atmosphériques (PM_{2.5}) »
Lepers C., Billet S., André V., Verdin A., Sichel F., Shirali P., Garçon G.

- Communications affichées :

31. Journée IRENI 2010 - Dunkerque 05/11/2010
« Étude de la génotoxicité d'aérosols atmosphériques particuliers (PM_{2.5}) »
Lepers C., Billet S., André V., Verdin A., Cazier F., Courcot D., Sichel F., Shirali P., Garçon G.

Prix du meilleur poster

32. Journée Environnement Santé APPA - Lille 30/11/2010
« Étude de la génotoxicité d'aérosols atmosphériques particuliers (PM_{2.5}) »
Lepers C., Billet S., André V., Verdin A., Cazier F., Courcot D., Sichel F., Shirali P., Garçon G.

33. 4^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest - Deauville 05-06/05/2011
« Génotoxicité et mutagénicité d'un aérosol atmosphérique particulaire (PM_{2.5}) d'origine urbano-industrielle »
Lepers C., Billet S., André V., Abbas I., Paget V., Le Goff J., Verdin A., Escande F., Garçon G., Shirali P., Sichel F.

34. *Journée IRENI 2011 - Douai 08/07/2011*

« Génotoxicité et mutagénicité d'un aérosol atmosphérique particulaire (PM_{2.5}) d'origine urbano-industrielle »

Lepers C., Billet S., André V., Abbas I., Paget V., Le Goff J., Verdin A., Escande F., Garçon G., Shirali P., Sichel F.

35. *Journée IRENI 2012 - Dunkerque 23/11/2012*

« Métabolisation de la fraction organique de particules fines (PM_{2.5}) : importance de la composition chimique »

Lepers C., André V., Billet S., Verdin A., LeGoff J., Garçon G., Dewaele D., Cazier F., Sichel F., Shirali P.

36. *Journée IRENI 2012 - Dunkerque 23/11/2012*

« Mesure par TD-μGC/MS de l'impact de l'exposition aux COVs de cellules humaines et végétales »

Cazier F., Billet S., Lepers C., Tisserant B., Chen W.

37. *6^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest - Deauville 15-17/05/2013*

« Modifications génotoxiques et épigénétiques des lymphocytes sanguins exposés *in vitro* à la pollution atmosphérique particulaire urbaine : Influence de l'âge »

Fougère B., Billet S., Lepers C., Martin P., Armand L., Bulckaen H., Roy Saint-Georges F., Verdin A., Gosset P., Shirali P.

TABLE DES MATIERES

Liste des Figures.....	i
Liste des Tableaux.....	vi
Abréviations & Notation.....	viii
Avant-Propos.....	xi
<i>Analyse Bibliographique</i>	1
1. Pollution Atmosphérique Particulaire.....	2
1.1. Contexte.....	3
1.2. Caractéristiques physico-chimiques des particules.....	7
1.3. Sources de particules atmosphériques.....	10
1.4. Contexte local : l'agglomération de Dunkerque.....	20
2. Particules et Cancer Broncho-pulmonaire.....	25
2.1. Physiologie de l'appareil respiratoire.....	26
2.2. Dépôt respiratoire et rétention des particules.....	33
2.3. Cancérogénèse broncho-pulmonaire.....	38
3. Mécanismes Cellulaires de Toxicité des PM _{2,5}	47
3.1. Stress oxydant.....	48
3.2. Activation métabolique.....	51
3.3. Lésions et réparation de l'ADN.....	55
3.4. Modifications épigénétiques.....	63
<i>Problématique et Objectifs</i>	73
<i>Matériels et Méthodes</i>	77
1. Réactifs.....	78
2. Echantillons de PM _{2,5}	80
2.1. Prélèvements.....	80
2.2. Caractérisation physico-chimique des PM _{2,5}	81
2.3. Préparation des PM _{2,5} pour les études toxicologiques.....	81
3. Matériels Biologiques.....	82
3.1. Souches de <i>Salmonella typhimurium</i>	82
3.2. Cellules BEAS-2B.....	82
4. Méthodes.....	83
4.1. Caractérisation de la fraction biologique.....	83
4.2. Test d'Ames.....	84
4.3. Culture et exposition des cellules.....	85
4.4. Tests de cytotoxicité.....	87
4.5. Dosage des protéines par méthode BCA.....	88
4.6. Détermination de l'expression des EMX par RT-qPCR.....	89
4.7. Activité EROD.....	92
4.8. Post-marquage au ³² P.....	93
4.9. Test des Comètes.....	95
4.10. Dosage de γ-H2AX.....	96
4.11. Formation de micronoyaux.....	98
4.12. Activité télomérase.....	99
4.13. Méthylation de l'ADN.....	101
4.14. Modifications post-traductionnelles d'histones.....	103
4.15. miRNA.....	106
4.16. Analyses statistiques.....	108

<i>Résultats et Discussion</i>	110
1. Notation des Echantillons de PM _{2.5}	111
2. Caractérisation de la Fraction Biologique.....	112
2.1. Contaminants bactériens.....	112
2.2. Contaminants fongiques.....	112
2.3. Discussion	113
3. Mutagénicité des PM _{2.5}	115
3.1. Souche TA102.....	115
3.2. Souche TA98.....	116
3.3. Souche YG1041	117
3.4. Modélisation	118
3.5. Corrélation avec la composition des PM _{2.5}	119
3.6. Discussion	119
4. Tests de Cytotoxicité.....	122
4.1. Résultats expérimentaux.....	122
4.2. Modélisation	122
4.3. Discussion	123
5. Métabolisation des Composés Organiques.....	125
5.1. Expression génique des EMX	125
5.2. Activité catalytique des CYP1A1 et 1B1.....	130
5.3. Corrélation avec la composition des PM _{2.5}	132
5.4. Discussion	133
6. Génotoxicité.....	136
6.1. Formation d'adduits encombrants à l'ADN.....	136
6.2. Fragmentation de l'ADN	137
6.3. Anomalies de ségrégation des chromosomes	140
6.4. Activité télomérase	141
6.5. Corrélation avec la composition des PM _{2.5}	142
6.6. Discussion	142
7. Modifications Epigénétiques.....	147
7.1. Méthylation de l'ADN.....	147
7.2. Modifications post-traductionnelles de l'histone 3.....	149
7.3. Expression des miRNA.....	150
7.4. Corrélation avec la composition des PM _{2.5}	153
7.5. Discussion	153
 <i>Discussion Générale</i>	 158
 <i>Conclusion et Perspectives</i>	 165
 <i>Références Bibliographiques</i>	 169

LISTE DES FIGURES

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

Analyse Bibliographique

Figure I.1	8
Répartition en nombre, surface spécifique et volume d'un aérosol atmosphérique continental.	
Figure I.2	9
Représentation schématique de la distribution granulométrique des aérosols et de leurs mécanismes de formation et de dépôt.	
Figure I.3	9
Composition relative d'échantillons de particules fines selon leur site de prélèvement urbain, rural, ou non-pollué.	
Figure I.4	9
Images en microscopie électronique de différents types de particules.	
Figure I.5	12
Emissions de PM _{2,5} en kilotonnes par secteur en France métropolitaine.	
Figure I.6	13
Répartition par secteur d'activité des émissions de différents polluants en France métropolitaine en 2010.	
Figure I.7	17
Mécanismes de formation des particules secondaires.	
Figure I.8	19
Evolution temporelle des contributions biologiques et anthropiques aux aérosols organiques secondaires.	
Figure I.9	20
Localisation de l'agglomération de Dunkerque et des sites industriels.	
Figure I.10	21
Principaux employeurs industriels de la zone d'emploi de Dunkerque.	
Figure I.11	22
Répartition dans la région Nord-Pas-de-Calais des émissions atmosphériques en SO ₂ , oxydes d'azote, benzène, CO ₂ , composés organiques volatiles non-méthaniques et plomb.	
Figure I.12	23
Répartition dans la région Nord-Pas de Calais des émissions atmosphériques de particules en suspension.	
Figure I.13	26
Structure de l'appareil respiratoire humain et organisation cellulaire.	
Figure I.14	28
Coupes histologiques de septum nasal de lapin.	
Figure I.15	29
Coupes histologiques de trachée humaine ou de porc.	
Figure I.16	30
Coupes histologiques de bronches extra-pulmonaires, de bronches de petit calibre et de bronchioles terminales.	
Figure I.17	30
Coupes histologiques de parenchyme pulmonaire de porc.	
Figure I.18	31
Images en microscopie électronique de septa inter-alvéolaires de porc.	

Figure I.19	31
Coupe histologique d'alvéole pulmonaire de porc et image en microscopie optique d'un macrophage alvéolaire humain « empoussiéré ».	
Figure I.20	33
Mécanismes de déposition des particules.	
Figure I.21	33
Influence de la morphologie pulmonaire, du diamètre des particules et du débit inspiratoire sur la déposition des particules.	
Figure I.22	34
Répartition des particules atmosphériques le long de l'arbre respiratoire humain selon leur diamètre.	
Figure I.23	36
Mécanismes de clairance des particules.	
Figure I.24	37
Coupes histologiques de bronchioles respiratoires montrant l'accumulation de particules au niveau du parenchyme pulmonaire.	
Figure I.25	38
Classification des cancers broncho-pulmonaires.	
Figure I.26	38
Coupes histologiques de tumeurs pulmonaires.	
Figure I.27	39
Propriétés des cellules cancéreuses.	
Figure I.28	40
Régulation du cycle cellulaire.	
Figure I.29	41
Voies de signalisation de l'apoptose.	
Figure I.30	43
Evolution histologique du tissu normal vers le carcinome <i>in situ</i> .	
Figure I.31	44
Mécanismes d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur.	
Figure I.32	45
Anomalies génétiques et épigénétiques impliquées dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire.	
Figure I.33	46
Synthèse des risques relatifs de mortalité par cancer broncho-pulmonaire décrits dans la littérature, en fonction de l'augmentation de la concentration en PM _{2.5} et PM ₁₀ .	
Figure I.34	48
Réponse cellulaire aux espèces réactives de l'oxygène.	
Figure I.35	48
Production d'espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydant enzymatiques et non-enzymatiques.	
Figure I.36	48
Conséquence des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN, les lipides et les protéines.	
Figure I.37	49
Réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat, en fonction de la masse et de la surface spécifique des particules.	
Figure I.38	49
Production de ROS par la réaction d'Haber-Weiss dépendante du fer.	
Figure I.39	50
Cycle redox des quinones.	
Figure I.40	51
Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques.	
Figure I.41	53
Voies de métabolisation du Benzo[a]Pyrène.	

Figure I.42	53
Voies de métabolisation du benzène.	
Figure I.43	54
Signalisation par l'AhR.	
Figure I.44	55
Bases de l'ADN et modifications par les espèces réactives de l'oxygène.	
Figure I.45	57
Formation d'un adduit benzo[a]pyrène-diol-époxyde à l'adénine.	
Figure I.46	58
Système de réparation par excision de base (BER).	
Figure I.47	58
Système de réparation par excision de nucléotide (NER).	
Figure I.48	59
Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN.	
Figure I.49	60
Structure de la télomérase.	
Figure I.50	61
Evolution du fuseau mitotique au cours du cycle cellulaire.	
Figure I.51	61
Interaction entre les chromosomes et le fuseau mitotique au niveau du kinétochore.	
Figure I.52	62
Formation d'un fuseau mitotique tripolaire après exposition aux PM _{2.5} .	
Figure I.53	63
Méthylation <i>de novo</i> et de maintenance	
Figure I.54	64
Différence de profil de méthylation entre les cellules normales et cancéreuses.	
Figure I.55	66
Structure du nucléosome.	
Figure I.56	66
Principaux acides aminés des histones soumis aux modifications post-traductionnelles.	
Figure I.57	66
Modifications post-traductionnelles des histones : phosphorylation, acétylation et méthylation.	
Figure I.58	68
Interactions entre les modifications post-traductionnelles d'histones.	
Figure I.59	69
Formation des miRNA.	
Figure I.60	71
Mode d'action des miRNA.	
Figure I.61	72
Coopération entre les mécanismes épigénétiques dans la régulation de la compaction de la chromatine.	

Problématique & Objectifs

Figure I.62	75
Protocole expérimental.	

Matériels & Méthodes

Figure II.1	80
Localisation des sites de prélèvement.	

Figure II.2.....	81
Distribution granulométrique des échantillons de PM _{2.5} .	
Figure II.3.....	84
Principe du test d'Ames.	
Figure II.4.....	87
Schéma d'exposition des microplaques pour les tests de cytotoxicité.	
Figure II.5.....	90
Structure et principe de fonctionnement de la sonde TaqMan®.	
Figure II.6.....	94
Principe du post-marquage au ³² P.	
Figure II.7.....	95
Aspect des noyaux en test des comètes selon l'intensité des dommages.	
Figure II.8.....	97
Procédure d'analyse des résultats de cytométrie en flux.	
Figure II.9.....	98
Images de cellules avec ou sans micronoyaux.	
Figure II.10.....	101
Réaction de conversion au bisulfite.	

Résultats & Discussion

Figure III.1.....	112
Photographies des cultures bactériennes.	
Figure III.2.....	112
Photographies des cultures fongiques.	
Figure III.3.....	115
Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche TA102.	
Figure III.4.....	116
Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche TA98.	
Figure III.5.....	117
Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche YG1041.	
Figure III.6.....	119
Coefficients directeurs de la régression linéaire réalisée sur les facteurs d'induction obtenus pour la souche YG1041.	
Figure III.7.....	122
Activité DHm dans les cellules exposées aux particules printemps-été.	
Figure III.8.....	122
Activité DHm dans les cellules exposées aux particules automne-hiver.	
Figure III.9.....	125
Quantification de l'ARNm du <i>CYP1A1</i> .	
Figure III.10.....	127
Quantification de l'ARNm du <i>CYP1B1</i> .	
Figure III.11.....	128
Quantification de l'ARNm du <i>CYP2S1</i> .	
Figure III.12.....	129
Quantification de l'ARNm de la <i>NQO1</i> .	
Figure III.13.....	131
Mesure de l'activité EROD.	
Figure III.14.....	136
Niveaux relatifs d'adduits encombrants à l'ADN.	

Figure III.15	136
Profils de migration des nucléotides marqués au ³² P.	
Figure III.16	137
Test des comètes.	
Figure III.17	138
Variation du taux de phosphorylation de H2AX.	
Figure III.18	140
Test des micronoyaux.	
Figure III.19	141
Activité télomérase.	
Figure III.20	147
Taux de méthylation du promoteur de <i>P16^{INK4A}</i> .	
Figure III.21	148
Taux de méthylation du promoteur de <i>MGMT</i> .	
Figure III.22	149
Taux d'acétylation de la lysine 18 de l'histone 3 (H3K18ac).	
Figure III.23	150
Taux de diméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me2).	
Figure III.24	151
Quantification de miR-21.	
Figure III.25	152
Quantification de miR-26b.	
Figure III.26	152
Quantification de miR-27a.	

Conclusion & Perspectives

Figure III.27	166
Représentation schématique du mode d'action et de l'implication potentiels des PM _{2.5} dans la cancérogénèse broncho-pulmonaire.	

LISTE DES TABLEAUX

Les numéros de page indiquent la première citation du tableau dans le texte.

Analyse Bibliographique

Tableau I.1	3
Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques.	
Tableau I.2	8
Comparaison du nombre relatif de particules et de la surface spécifique relative de l'aérosol en fonction du diamètre des particules.	
Tableau I.3	8
Contribution des constituants majoritaires à la composition des particules.	
Tableau I.4	15
Caractéristiques des HAP les plus fréquemment retrouvés dans les particules.	
Tableau I.5	28
Éléments constituant la paroi des voies respiratoires.	
Tableau I.6	44
Loci fréquemment concernés par des pertes d'hétérozygotie dans les cancers broncho-pulmonaires.	
Tableau I.7	64
Gènes suppresseurs de tumeur fréquemment hyperméthylés dans les cancers broncho-pulmonaires.	
Tableau I.8	67
Histones acétyltransférases et histones désacétylases identifiées chez les mammifères.	

Matériels & Méthodes

Tableau II.1	81
Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de PM _{2.5} .	
Tableau II.2	82
Caractéristiques des souches de <i>Salmonella typhimurium</i> utilisées.	
Tableau II.3	102
Amorces et conditions de PCR utilisées.	
Tableau II.4	105
Anticorps utilisés pour les expériences de <i>Western-Blot</i> .	
Tableau II.5	107
Séquence des amorces utilisées pour la quantification des miRNA.	

Résultats & Discussion

Tableau III.1	111
Notation des échantillons de PM _{2.5} .	
Tableau III.2	112
Dénombrement des colonies bactériennes dans les échantillons de PM _{2.5} .	
Tableau III.3	112
Dénombrement des colonies fongiques dans les échantillons de PM _{2.5} .	
Tableau III.4	113
Genres fongiques identifiés dans les échantillons de PM _{2.5} .	
Tableau III.5	115
Facteurs d'induction observés pour 50 µg / boîte de PM _{2.5} .	

Tableau III.6	116
Comparaisons intersites de la réponse de la souche TA98 aux PM _{2.5} .	
Tableau III.7	117
Comparaisons intersites de la réponse de la souche YG1041 aux PM _{2.5} .	
Tableau III.8	118
Comparaisons intercampagnes de la réponse de la souche YG1041 aux PM _{2.5} .	
Tableau III.9	118
Coefficients des modèles de régression linéaire sur la souche YG1041.	
Tableau III.10	119
Corrélations entre la composition des PM _{2.5} et les facteurs d'induction.	
Tableau III.11	123
Coefficients des modèles de régression logistique.	
Tableau III.12	125
Comparaisons intersites du niveau d'induction du <i>CYP1A1</i> .	
Tableau III.13	127
Comparaisons intersites du niveau d'induction du <i>CYP1B1</i> .	
Tableau III.14	128
Comparaisons intersites du niveau d'induction du <i>CYP2S1</i> .	
Tableau III.15	130
Comparaisons intersites du niveau d'induction du <i>NQO1</i> .	
Tableau III.16	131
Comparaisons intersites de l'activité EROD.	
Tableau III.17	132
Comparaisons intercampagnes de l'activité EROD.	
Tableau III.18	132
Corrélations entre la composition des PM _{2.5} et l'induction des EMX.	
Tableau III.19	138
Comparaisons intersites des résultats du test des comètes.	
Tableau III.20	139
Comparaisons intersites du taux de γ -H2AX.	
Tableau III.21	139
Comparaisons intercampagnes du taux de γ -H2AX.	
Tableau III.22	141
Comparaisons intersites de l'activité télomérase.	
Tableau III.23	142
Corrélations entre la composition des PM _{2.5} et les marqueurs de génotoxicité.	
Tableau III.24	150
Comparaisons intercampagnes de la réduction du taux de H3K4me2.	
Tableau III.25	151
Comparaisons intercampagnes du niveau d'expression de miR-21.	
Tableau III.26	152
Effet de la dose sur le niveau d'expression de miR-26b.	
Tableau III.27	153
Corrélations entre la composition des PM _{2.5} et les effets épigénétiques.	
Tableau III.28	160
Intensité des effets obtenus selon l'origine des échantillons de PM _{2.5} .	

ABBREVIATIONS & NOTATION

Cette liste est reproduite au début du document sur une feuille A3 pliée, utilisable comme marque-page.

- 1-9** 8-OHdG : 8-HydroxydésoxyGuanosine
- A** ABC : ATP-Binding Cassette
ADH : Alcool DésHydrogénase
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
AKR : AldoKetoReductase
ANOVA : ANalysis Of VAriance
ARE : Antioxidant Responsive Element
ARNT : Aryl Receptor Nuclear Translocator
- B** B[a]P : Benzo[a]Pyrène
B[a]P-CEC : Benzo[a]Pyrène - Carcinogenic Equivalent Concentration
BCA : BiCinchoninique Acid
BEGM : Bronchial Epithelial cells Growth Medium
BER : Base Excision Repair
BET : Bromure d'ETHidium
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BPDE : Benzo[a]Pyrène-7,8-Diol-9,10-Epoxyde
BrdU : Bromo-2'-désoxyUridine
BSA : Bovine Serum Albumine
- C** CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique
CFU : Colony-Forming Units
COV : Composé Organique Volatil
COVNM : Composé Organique Volatil Non-Méthanique
cpm : coups par minute
Ct : Cycle threshold, Cycle seuil
CYP : CYtochrome P450
- D** D_{ae} : Diamètre Aérodynamique Equivalent
DEP : Diesel Exhaust Particle
DHm : DésHydrogénase mitochondriale
DL-PCB : Dioxin-Like PolyChloroBiphenyl
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DNMT : DNA MethylTransferase
DREAL : Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement
- E** EDTA : EthyleneDiamine TetraAcetic Acid
EHm : Epoxyde Hydrolase microsomale
EMX : Enzyme de Métabolisation des Xénobiotiques
EOM : Extractable Organic Matter
EROD : Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase
- F** FI : Facteur d'Induction
- G** γ-H2AX : histone H2AX phosphorylée (Ser139)
GG-NER : Global Genome NER
GPx : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférase

H H3K18ac : histone 3 acétylée (Lys18)
H3K4me2 : histone 3 diméthylée (Lys4)
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HAT : Histone AcétylTransférase
HDAC : Histone DésAcétylase
HMT : Histone MéthylTransférase
HR : Homologous Recombination
HRP : HorseRadish Peroxidase

I IgA : ImmunoGlobuline de type A
IgG : ImmunoGlobuline de type G
INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
iREP : Registre des Emissions Polluantes
ITEQ : International Toxic Equivalent

L LDH : Lactate DésHydrogénase
LINE-1 : Long Interspersed Nuclear Element 1
LOH : Loss Of Heterozygosity

M MDA : MalonDiAldéhyde
MFI : Median Fluorescence Intensity
MGB : Minor Groove Binder®
MGMT : O⁶-MethylGuanine DNA-MethylTransferase
miRNA : micro-ARN
MPT : Modification Post-Traductionnelle
MSP : Methylation Specific PCR

N NER : Nucleotide Excision Repair
NHEJ : Non-Homologous End Junction
NOx : Oxydes d'Azote
NP1 : Nucléase P1
NQO1 : NADPH-Quinone-Oxydoreductase 1
NSCLC : Non Small Cell Lung Carcinoma

O OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCB : PolyChloroBiphényles
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
PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PNK : T4 PolyNucléotide Kinase
PNSE 2 : 2^{ème} Plan National Santé Environnement
POP : Polluant Organique Persistant
pri-miRNA : primary-miRNA
PVDF : PolyVinylidene DiFluoride
PVP : PolyVinylPyrrolidone

Q [Q1;Q3] : [1^{er} quartile ; 3^{ème} quartile]
qPCR : PCR quantitative en temps réel

R RAL : Relative Adduct Level
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RLC : RISC Loading Complex

ROS : Reactive Oxygen Species
 RQ : Relative Quantity
 RT : Rétro-Transcription

- S** S9 : microsomes d'hépatocytes de rat obtenus par centrifugation à 9 000 g
 SCC : Squamous Cell Carcinoma
 SCLC : Small Cell Lung Carcinoma
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 SOD : SuperOxyde Dismutase
 SPD : Spleen PhosphoDiesterase
 SULT : SulfoTransférase
- T** TC-NER : Transcription-Coupled NER
 TCDD : 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-*p*-Dioxine
 TEB : Triton Extraction Buffer
 TEF : Toxicity Equivalence Factor
 TEMED : N,N,N',N'-TetraMéthylEthylèneDiamine
 Tm : Température de fusion
 TRS : Taux de Réversion Spontanée
- U** UGT : UDP-GlucuronosylTransférase
- X** XRE : Xenobiotic Responsive Element

Notation des échantillons de PM_{2,5}

Campagne	Site	Concentration	Notation
Printemps-Eté 2008 (1)	Industriel (1I)	3,75 µg / cm ²	1I1
		15 µg / cm ²	1I2
	Urbain (1U)	3,75 µg / cm ²	1U1
		15 µg / cm ²	1U2
	Rural (1R)	3,75 µg / cm ²	1R1
		15 µg / cm ²	1R2
Automne-Hiver 2008-2009 (2)	Industriel (2I)	3,75 µg / cm ²	2I1
		15 µg / cm ²	2I2
	Urbain (2U)	3,75 µg / cm ²	2U1
		15 µg / cm ²	2U2
	Rural (2R)	3,75 µg / cm ²	2R1
		15 µg / cm ²	2R2

AVANT-PROPOS

La pollution atmosphérique est un problème majeur de santé publique, qui 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, éléments solides en suspension dans l'air susceptibles, selon leur taille, d'être inhalées puis retenues au niveau pulmonaire. L'exposition aux particules, notamment aux plus fines d'entre elles, a été associée à l'aggravation ou à l'apparition de différentes pathologies cardio-respiratoires telles que l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, ou encore les cancers broncho-pulmonaires.

Ces particules se révèlent être un mélange complexe de composés plus ou moins nocifs, dont les effets délétères individuels peuvent éventuellement être modifiés ou renforcés par leurs interactions. Cet « effet cocktail » rend d'autant plus difficile l'appréhension de la toxicité pulmonaire des particules et différentes approches complémentaires sont donc nécessaires pour tenter de comprendre leurs mécanismes d'action.

*Cette thèse s'inscrit dans une démarche d'identification des processus impliqués dans la toxicité des particules atmosphériques, en lien avec un éventuel potentiel cancérigène. Il est important de souligner que l'étude présentée ici est basée sur une approche toxicologique *in vitro*. Les résultats décrits dans ce travail ne pourront donc en aucun cas apporter la preuve d'un effet cancérigène des particules atmosphériques et tel n'est pas leur objectif. Ils ont plutôt pour but de soulever des hypothèses mécanistiques afin d'expliquer certains effets toxiques observés dans le cadre d'études épidémiologiques, hypothèses qui pourront par la suite être testées, puis validées ou infirmées, par des études *in vivo*.*

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. POLLUTION ATMOSPHERIQUE 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.	Contexte	3
1.1.1.	Réglementation relative aux polluants atmosphériques	3
1.1.2.	Contexte national	5
1.1.3.	Définitions relatives à la pollution atmosphérique	6
1.2.	Caractéristiques physico-chimiques des particules	7
1.2.1.	Propriétés physiques	7
1.2.1.1.	Taille	7
1.2.1.2.	Surface spécifique	7
1.2.1.3.	Distribution d'un aérosol	8
1.2.2.	Composition	8
1.2.2.1.	Composition chimique type	8
1.2.2.2.	Fraction biologique	9
1.3.	Sources de particules atmosphériques	10
1.3.1.	Sources naturelles de particules primaires	10
1.3.1.1.	Erosion des sols	10
1.3.1.2.	Aérosols marins	11
1.3.1.3.	Eruptions volcaniques	11
1.3.1.4.	Feux de forêt	11
1.3.2.	Sources anthropiques de particules primaires	12
1.3.2.1.	Secteur résidentiel et tertiaire	12
1.3.2.2.	Industrie manufacturière	12
1.3.2.3.	Trafic routier	13
1.3.2.4.	Agriculture et sylviculture	14
1.3.2.5.	Combustion et métaux lourds	14
1.3.3.	Sources de polluants organiques persistants	14
1.3.3.1.	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	14
1.3.3.2.	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxines et furanes	15
1.3.3.3.	Polychlorobiphényles	16
1.3.4.	Sources de précurseurs de particules secondaires	17
1.3.4.1.	Gaz soufrés	17
1.3.4.2.	Oxydes d'azote	18
1.3.4.3.	Composés organiques volatils non-méthaniques	19
1.4.	Contexte local : l'agglomération de Dunkerque	20
1.4.1.	Données démographiques, géographiques et économiques	20
1.4.1.1.	Composition de la zone industrielle de Dunkerque	20
1.4.1.2.	Emploi industriel à Dunkerque	21
1.4.2.	Bilan des émissions atmosphériques	21
1.4.2.1.	Polluants gazeux	22
1.4.2.2.	Plomb	22
1.4.2.3.	Emissions de particules	23

1.1. Contexte

1.1.1. Réglementation relative aux polluants atmosphériques

Au cours du XX^{ème} siècle, trois épisodes majeurs de pollution ont fait prendre conscience du risque représenté par la pollution atmosphérique. Du 1^{er} au 5 décembre 1930, la vallée de la Meuse, en aval de la ville de Liège, a été victime d'un épais nuage de suie conduisant à 60 décès en 3 jours (Nemery *et al.*, 2001). Dix-huit ans plus tard, en octobre 1948, un nuage de particules et de gaz a stagné sur la ville de Donora, Pennsylvanie, pendant 5 jours, rendant malades 35 à 50 % des 14 000 habitants et conduisant à 400 hospitalisations et 20 décès avant la dispersion du nuage (Helfand *et al.*, 2001). Enfin, le smog de Londres de 1952 a été la cause de plusieurs milliers de décès à plus ou loin long terme. Une première estimation a fait état de 3 000 morts (Logan, 1953), mais des analyses plus récentes suggèrent que cet épisode de pollution aurait en réalité causé 12 000 décès (Bell and Davis, 2001).

Ces événements ont fait réagir les autorités publiques, conduisant à la mise en place de différentes mesures, telles que le « *Air Pollution Control Act* » publié en 1955 puis renforcé par les « *Clean Air Acts* » de 1963, 1970 et 1990 aux Etats-Unis, le programme « Air Pur pour l'Europe » datant de 2001 et la « Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie » promulguée en France en 1996. Cette dernière reconnaît « à chacun [*le droit de*] respirer un air qui ne nuise pas à sa santé », objectif devant être atteint par une « action d'intérêt général » consistant à « prévenir, à surveiller, à réduire ou à supprimer les pollutions atmosphériques, à préserver la qualité de l'air et, à ces fins, à économiser et à utiliser rationnellement l'énergie ». La pollution atmosphérique est ainsi définie comme « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ».

Cette volonté de protection des populations s'est traduite en France par la mise en place de valeurs limites dans l'air extérieur pour un certain nombre de polluants, définies par le 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 (MEDDE, 2010). Différentes normes ont ainsi été fixées pour certains polluants (Tableau I.1), définies par ce même décret comme :

- **objectif de qualité**, un niveau à atteindre à long terme et à maintenir, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une

	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)			

Tableau I.1 : Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques (d'après MEDDE, 2010).
PM : Particulate Matter ; B[a]P : Benzo[a]Pyrène.

- protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble ;
- **valeur cible**, un 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**, un 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**, un 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**, un niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l'ensemble de la population ou de 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 : le dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃), le dioxyde de soufre (SO₂), le monoxyde de carbone (CO) et le benzène (C₆H₆).

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* » (MEDDE, 2010). Il convient de signaler que ces nouvelles valeurs définies pour les « PM_{2.5} », fixées à 25 µg / m³ à partir de l'année 2015 sont encore très éloignées de l'objectif de qualité de 10 µg / m³ en moyenne annuelle.

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 cancérigène 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, préalablement qualifiés de métaux lourds, dont la concentration atmosphérique est réglementée.

1.1.2. Contexte national

La mise en place de ces valeurs réglementaires s'intègre dans le contexte plus vaste du deuxième Plan National Santé - Environnement 2009 - 2013 (PNSE 2). Celui-ci se décompose en deux axes, visant à « *réduire les expositions responsables de fort impact sur la santé* » et à « *réduire les inégalités environnementales* ».

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 PNSE 2 : « *identifier et gérer les zones géographiques pour lesquelles on observe une surexposition à des substances toxiques* ».

Parmi les 58 actions du PNSE 2, sept visent à une réduction des émissions atmosphériques de substances toxiques. Ainsi, l'action 5 du PNSE 2 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 associés,
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques,
- 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.

1.1.3. Définitions relatives à la pollution atmosphérique

Avant de nous intéresser plus en détails à ces particules, il convient de redéfinir un certain nombre de termes relatifs à la pollution atmosphérique (Seinfeld and Pandis, 1998) :

- les termes d'**aérosols**, **aérocolloïdes** et **systèmes aérodispersés** font référence à des particules de petite taille dispersées dans un gaz ;
- 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 ;
- le mot **brouillard** (*fog*) est un terme vague appliqué aux aérosols visibles dont la partie dispersée est liquide ;
- le mot **particule** (*particle*) désigne 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 ;
- 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 de « goudron » formés lors de la combustion incomplète de matériaux carbonés.

1.2. Caractéristiques physico-chimiques des particules

Comme nous venons de le voir, le terme de particule peut s'appliquer à de multiples éléments, qui peuvent présenter des caractéristiques physico-chimiques extrêmement variables. Ainsi, différentes propriétés des particules atmosphériques (Particulate Matter, PM) sont fréquemment utilisées pour caractériser un aérosol d'intérêt.

Au cours de ce chapitre, nous expliciterons les notions de granulométrie et de surface spécifique, nous étudierons le lien entre ces deux paramètres au sein d'un aérosol, et nous aborderons la composition générale de particules atmosphériques.

1.2.1. Propriétés physiques

1.2.1.1. 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 $10 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{>10}$),
- les grosses particules, ayant un D_{ae} inférieur à $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}),
- les particules fines, dont le D_{ae} est inférieur à $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$),
- les particules ultrafines, appelées nanoparticules si elles sont manufacturées, ayant un D_{ae} inférieur à $0,1 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0.1}$).

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

1.2.1.2. 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.

1.2.1.3. 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 (Figure I.1). 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 I.2). 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).

1.2.2. Composition

1.2.2.1. 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 trace, tels que les métaux ou les dioxines (Harrison and Yin, 2000). La notion de trace 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 les données issues de 60 sites de prélèvement montrent que les principaux constituants des $PM_{2.5}$ et des PM_{10} 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 (Tableau I.3). Ainsi, si l'on considère des particules prélevées

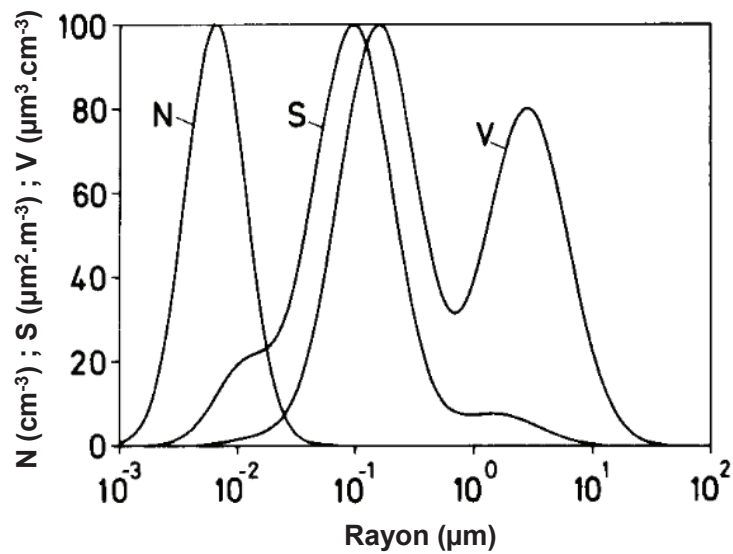


Figure I.1 : Répartition en nombre (N), surface spécifique (S) et volume (V) d'un aérosol atmosphérique continental (d'après Heintzenberg, 1989).

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

Tableau I.2 : 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.

		PM ₁₀			PM _{2.5}			PM _{2.5-10}		
		Rural	Urbain	Trafic	Rural	Urbain	Trafic	Rural	Urbain	Trafic
Europe du Nord-Ouest	Poussières minérales	4%	12%		5%	1%		26%		
	Sels marins	12%	10%	7%	4%	1%		15%		
	SO ₄ ²⁻	13%	14%	8%	21%	18%		6%		
	NO ₃ ⁻	16%	14%	12%	16%			20%		
	Matière organique	15%	18%	16%	25%			14%		
	Carbone élémentaire	4%	5%	9%	7%			1%		
	Carbone total	14%	18%	20%	25%			12%		
Europe du Sud	Poussières minérales	15%	21%	28%	11%	14%		42%	69%	
	Sels marins	3%	12%	5%	6%	2%		22%	11%	
	SO ₄ ²⁻	16%	12%	12%	15%	15%		4%	5%	
	NO ₃ ⁻	14%	9%	8%	7%	7%		11%	9%	
	Matière organique		26%		23%			13%		
	Carbone élémentaire		6%		8%			2%		
	Carbone total	13%	21%	28%	30%	38%		11%		
Europe Centrale	Poussières minérales	9%	12%	15%	3%	5%	6%	22%	25%	29%
	Sels marins	2%	2%	2%	1%	1%	1%	2%	3%	5%
	SO ₄ ²⁻	19%	15%	9%	17%	19%	12%	5%	4%	4%
	NO ₃ ⁻	13%	12%	8%	6%	13%	10%	10%	7%	6%
	Matière organique	23%	21%	21%	15%	22%	26%	5%	15%	13%
	Carbone élémentaire	6%	10%	17%	5%	14%	21%	3%	3%	10%
	Carbone total	32%	32%	38%	19%	31%	35%	6%	14%	19%

Tableau I.3 : Contribution des constituants majoritaires à la composition des particules selon leur origine (d'après Putaud *et al.*, 2010).
PM : *Particulate Matter*.

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 (Blieffer and Perraud, 2009) (Figure I.2). Dans le cas précédemment évoqué, les PM₁₀ proviendraient en grande partie de l'érosion des routes, alors que les PM_{2.5} seraient formées à partir des gaz d'échappement des véhicules.

Si le mode de formation des particules joue un rôle important dans leur composition, leur origine est elle aussi un élément déterminant. En effet, des variations de composition sont observées entre des PM_{2.5} issues de sites urbains, ruraux, ou considérés comme non-pollués car isolés de toute ville ou industrie. Ainsi, les échantillons de PM_{2.5} urbains sont caractérisés par la prépondérance du carbone organique, alors que les échantillons ruraux sont marqués par une majorité de sulfates (Figure I.3). Les échantillons provenant de sites non-pollués contiennent également des sulfates, mais dans des proportions beaucoup plus faibles, ainsi que différents éléments d'origine crustale et marine (Heintzenberg, 1989). L'ensemble de ces données montrent donc l'importance des sources d'émission de particules dans leur composition.

1.2.2.2. 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 I.4.A). Une étude de Glikson *et al.* montre que l'aérosol biogénique peut représenter jusqu'à 5 % des PM₂₋₁₀ 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* (Janovici 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).

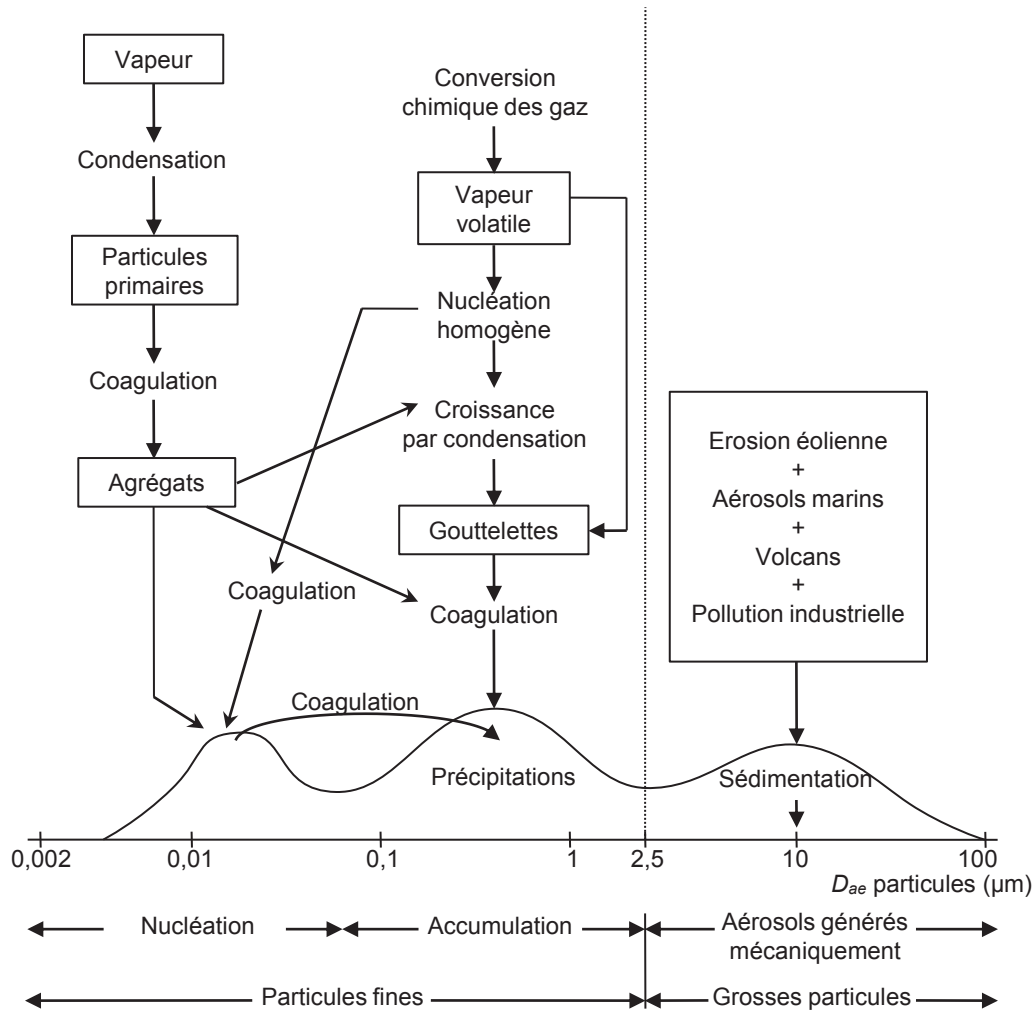


Figure I.2 : Représentation schématique de la distribution granulométrique des aérosols et de leurs mécanismes de formation et de dépôt (d'après Whitby et Cantrell, 1976).

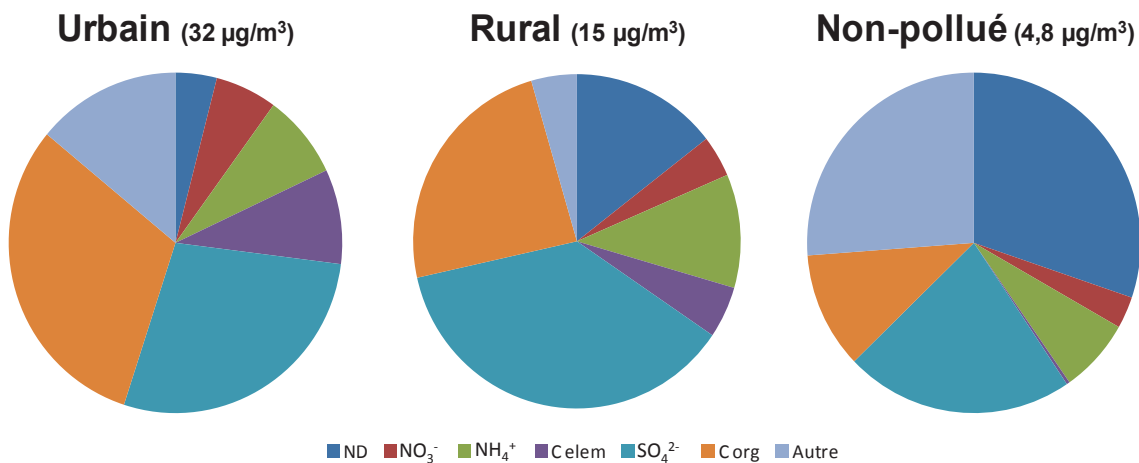


Figure I.3 : Composition relative d'échantillons de particules fines selon leur site de prélèvement urbain, rural, ou non-pollué (d'après Heintzenberg, 1989).

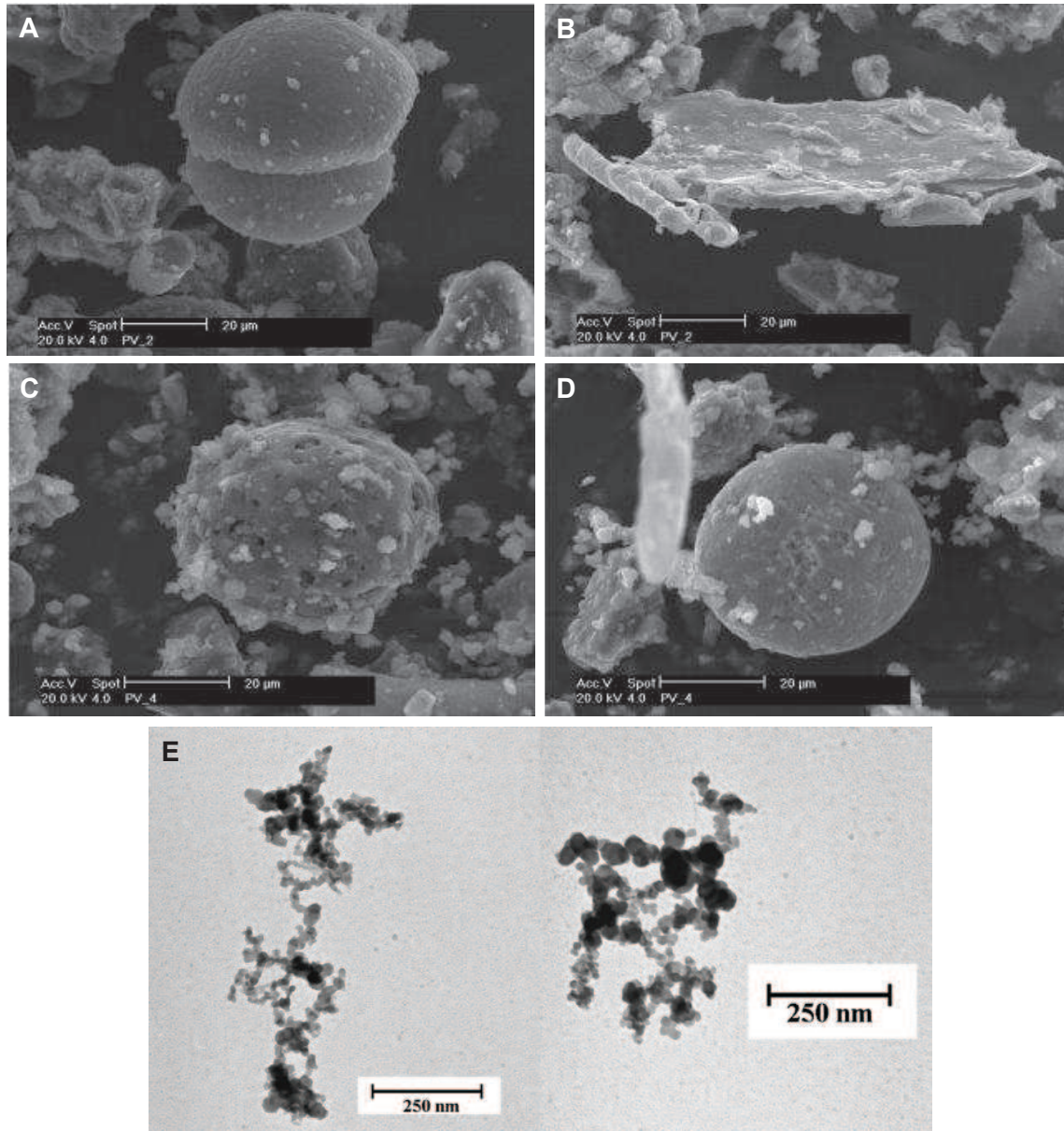


Figure I.4 : Images en microscopie électronique d'une particule biologique (A), d'un phyllosilicate (B), d'une particule carbonée (C), d'une particule métallique (D) et de particules émises par un moteur diesel (E) (A-D : Nava *et al.*, 2010 ; E : Rissler *et al.*, 2012).

1.3. Sources de particules atmosphériques

Nous venons de décrire la composition type d'un aérosol atmosphérique, tout en soulignant sa grande variabilité selon les sources d'émission présentes. Les particules peuvent être rejetées directement ou produites indirectement dans l'atmosphère, à partir de nombreuses sources naturelles ou anthropiques. Selon leur mécanisme de formation, les particules sont définies comme primaires si elles sont émises directement dans l'atmosphère ou formées par une condensation rapide de molécules de gaz émises, ou comme secondaires si elles résultent de la transformation chimique de précurseurs dans l'atmosphère.

Au cours de ce chapitre, nous nous appuierons sur ces deux caractéristiques d'origine et de type de particules, pour établir un inventaire des sources de particules atmosphériques. Nous détaillerons dans un premier temps les sources naturelles et anthropiques de particules primaires, puis aborderons la question des polluants organiques persistants, pouvant intervenir dans la composition des particules primaires ou secondaires, avant de terminer par une évaluation des émissions naturelles et anthropiques de précurseurs de particules secondaires.

1.3.1. Sources naturelles de particules primaires

1.3.1.1. Erosion des sols

Les particules d'origine naturelle sont essentiellement constituées de particules minérales générées mécaniquement par érosion éolienne des sols. De manière générale, ces particules sont constituées de silicates (Figure I.4.B), tels que le quartz, la kaolinite et le feldspath, de carbonates, majoritairement représentés par la calcite, et dans une moindre mesure de sulfates de calcium et d'oxydes de fer. La composition de ces particules dépend des caractéristiques géologiques de la zone considérée, comme l'illustre une étude conduite dans la région de Rome récemment publiée (Pietrodangelo *et al.*, 2013). Il convient néanmoins de prendre également en compte les sources naturelles lointaines dans la composition des aérosols atmosphériques, car les particules peuvent être transportées sur de longues distances. En effet, des particules d'origine saharienne, caractérisées par leur très grande proportion de quartz (environ 70 %) ont été retrouvées parmi les PM₁₀ collectées à Naples (Adamo *et al.*, 2008; Adedokun *et al.*, 1989). A noter cependant qu'une partie des particules terrigènes est en fait remise en suspension dans l'atmosphère par les activités humaines. D'après une étude de Querol *et al.*, 30 à 50 % des éléments terrigènes

constituant les PM₁₀ en milieu urbain seraient ainsi dus à des activités humaines telles que la construction, la démolition et le trafic routier (Querol *et al.*, 2004).

1.3.1.2. Aérosols marins

En plus de ces particules terrigènes, les aérosols d'origine marine, couramment appelés *sea spray*, représentent une forte proportion des particules d'origine naturelle, particulièrement dans les zones côtières. Ils sont essentiellement constitués de chlorure de sodium (NaCl) et de sulfates de sodium, magnésium ou potassium (Na₂SO₄, MgSO₄ et K₂SO₄). Ils se forment suite à l'assèchement rapide par le vent des bulles formées à la surface des océans (Bliefer and Perraud, 2009).

1.3.1.3. Eruptions volcaniques

Les éruptions volcaniques sont également des sources de particules primaires, bien qu'ayant une contribution temporelle limitée. En fonction des conditions climatiques, elles peuvent cependant être transportées sur des distances importantes comme le montre la présence à Prague de cendre volcaniques issues de l'éruption en 2010 du volcan Eyjafjallajökull situé en Islande (Navrátil *et al.*, in press). Les particules d'origine volcanique sont principalement composées de verre et contiennent également des pyroxènes, feldspaths, plagioclases et aluminosilicates.

1.3.1.4. Feux de forêt

Les feux de forêt sont eux aussi une source de particules primaires fréquemment décrite. Tout comme les éruptions volcaniques, ils ont une incidence spatiale et temporelle limitée. Néanmoins, ils peuvent être à l'origine d'une émission intense de particules sur une faible durée. Alves *et al.* estiment ainsi que les feux de forêt ayant eu lieu au Portugal en 2009 ont produit entre 0,5 et 42 g de PM_{2.5} et 1 à 60 g de PM₁₀ par kg, en poids sec, de biomasse brûlée (Alves *et al.*, 2011). Les PM_{2.5} émises sont constituées à plus de 50 % en masse de carbone organique et à 3,9 % en masse d'ions hydrosolubles, majoritairement Na⁺, NH₄⁺, Cl⁻ et NO₃⁻ (Vicente *et al.*, 2013). De manière générale, les quantités de PM_{2.5} émises par la combustion de biomasse dépend du type de végétation considérée, et oscille en moyenne entre 3 et 35 g / kg de biomasse brûlée (Alves *et al.*, 2010; Andreae and Merlet, 2001; McMeeking *et al.*, 2009; Ward and Hardy, 1991).

1.3.2. Sources anthropiques de particules primaires

Bien que les émissions de particules d'origine humaine diminuent régulièrement depuis 1991, ce sont toujours près de 255 000 tonnes de $PM_{2.5}$ et 367 000 tonnes de PM_{10} anthropogéniques qui sont rejetées chaque année en France métropolitaine (CITEPA, 2012). Si l'on s'intéresse aux secteurs d'activité responsables des émissions de $PM_{2.5}$, le secteur résidentiel est le principal émetteur (39 %), alors que l'industrie manufacturière émet 29 % des $PM_{2.5}$, le transport routier 19 % et que les activités d'agriculture et de sylviculture sont responsables de 10 % des émissions (Figure I.5). Les contributions respectives des différents secteurs sont en revanche différentes pour les PM_{10} . Elles sont ainsi émises à 33 % par l'industrie, 27 % par le secteur résidentiel et tertiaire, 19 % par l'agriculture et 17 % par le transport routier. Le secteur de la transformation de l'énergie ainsi que les autres modes de transport ne sont à l'origine que d'une faible proportion des $PM_{2.5}$ et PM_{10} émises par les activités humaines, à savoir 1 à 2 % de chaque type de particules par secteur (CITEPA, 2012).

1.3.2.1. Secteur résidentiel et tertiaire

Les particules issues du secteur résidentiel et tertiaire sont majoritairement issues des procédés de chauffage au bois, au fioul ou au charbon. Ce sont principalement des particules fines contenant un noyau carboné. Etant donné leur grande surface spécifique, de nombreux composés organiques, tels que des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), peuvent être adsorbés à leur surface (Figure I.4.C).

1.3.2.2. Industrie manufacturière

Les particules issues de l'industrie sont de taille et de composition variable en fonction du domaine d'activité considéré. Ainsi, le secteur de la construction est responsable de l'émission de 8,1 % des PM_{10} , mais contribue deux fois moins aux émissions de $PM_{2.5}$ (4,6 %). L'industrie des minéraux non-métalliques et des matériaux de construction (e.g. cimenterie, briqueterie) émettent 15 % des PM_{10} et des $PM_{2.5}$ (CITEPA, 2012). L'ensemble de ces secteurs industriels émet des particules de composition proche des particules terrigènes. A l'inverse, la métallurgie des métaux ferreux émet 1,4 % des $PM_{2.5}$. Les particules émises par ce secteur sont généralement constituées d'un noyau métallique et présentent une faible surface spécifique de part leur morphologie sphéroïde lorsqu'elles sont produites à haute température (Figure I.4.D).

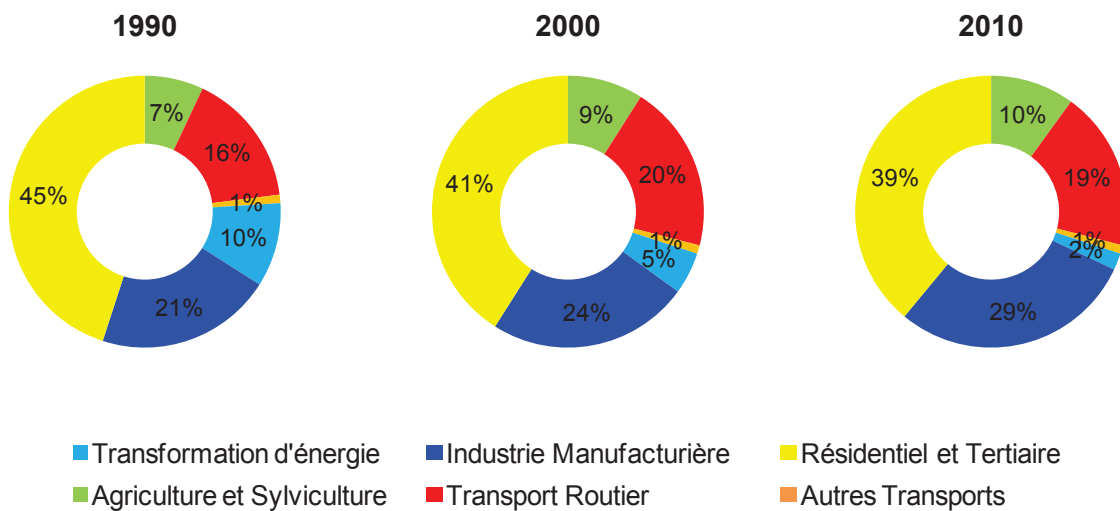
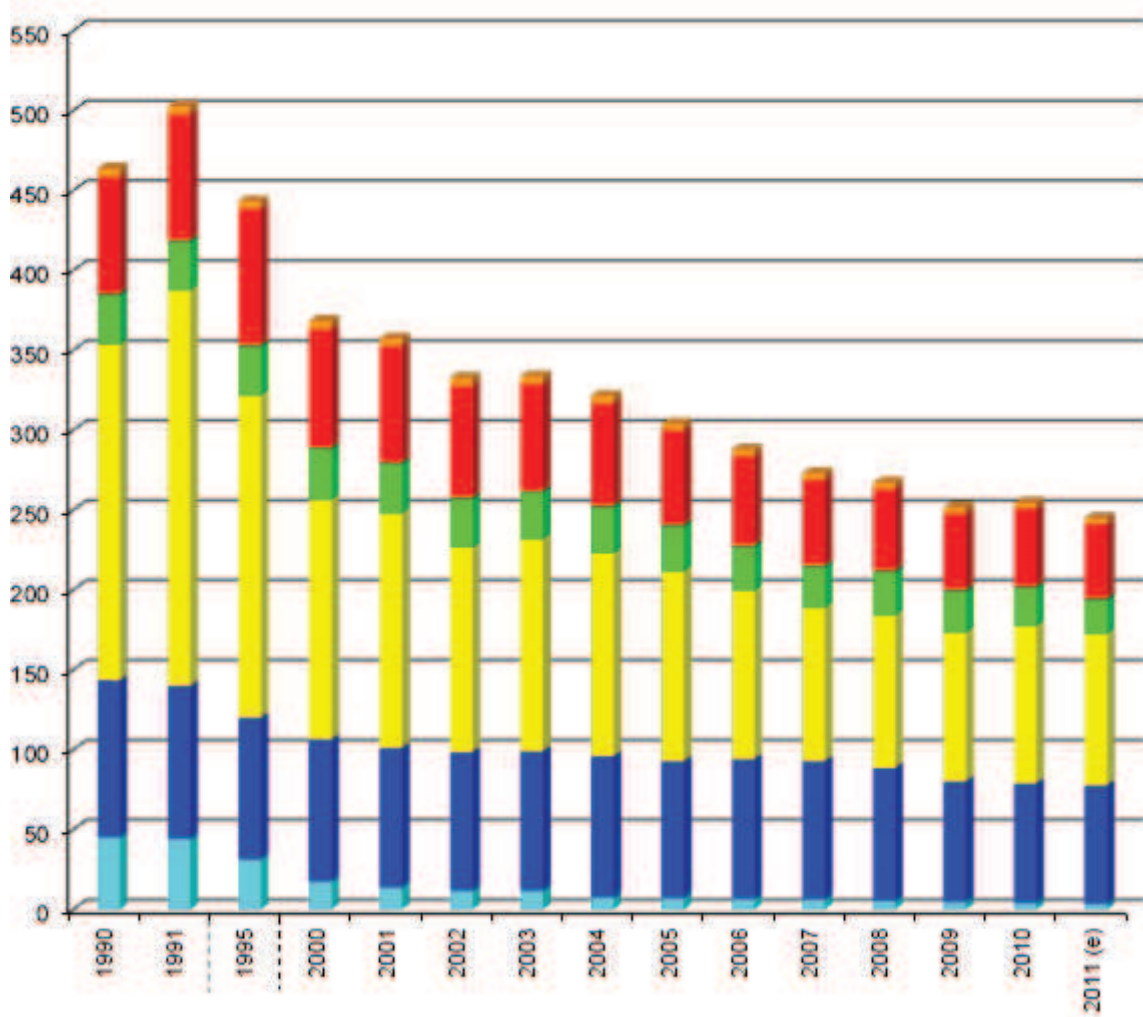


Figure I.5 : Emissions de PM_{2.5}, en kilotonnes et par secteur, en France métropolitaine (données CITEPA, 2012).
(e) estimation préliminaire.

L'industrie est responsable de l'émission d'une grande majorité des métaux lourds (Figure I.6.A). La nature des métaux émis dépend cependant du type d'industrie :

- l'arsenic (As) est issu de matières premières utilisées dans la production de certains verres, ainsi que de métaux ferreux ou non-ferreux ;
- le cadmium (Cd) est émis par les secteurs de la sidérurgie, la métallurgie des métaux non-ferreux et la production de céramique ;
- le chrome (Cr) provient principalement (51,5 %) de la production des métaux ferreux, en particulier des aciéries électriques et des fonderies et, dans une moindre mesure (17,4 %), du secteur des minéraux non-métalliques et des matériaux de construction ;
- le mercure (Hg) est principalement produit par le secteur chimique (30 %), et notamment la production de chlore (54 % du secteur chimie), par la métallurgie des métaux ferreux à 23 %, ainsi que les minéraux non-métalliques et matériaux de construction à hauteur de 20 %, dont 43 % sont liés aux cimenteries ;
- le nickel (Ni) d'origine industrielle est associé aux installations sidérurgiques ;
- le plomb (Pb) provenant de l'industrie est issu à 71 % de la métallurgie des métaux ferreux ;
- le sélénium (Se) est majoritairement émis par la production de verre (70 % du secteur des minéraux non-métalliques) et des matériaux de construction (86 % des émissions industrielles) ;
- le zinc (Zn) émanant de l'industrie manufacturière est essentiellement issu de la métallurgie des métaux ferreux (CITEPA, 2012).

1.3.2.3. Trafic routier

Le trafic routier émet quant à lui plusieurs types de particules :

- des particules fines carbonées, issues du fonctionnement des moteurs,
- des particules grossières, issues de l'abrasion des routes, et de composition proche des particules terrigènes,
- des particules issues de l'abrasion de pneus et des freins, caractérisées par leur richesse en cuivre, dans le cas des freins, ou en zinc, pour les pneus (Davis *et al.*, 2001).

Les particules émises par les véhicules automobiles proviennent en grande majorité des moteurs diesel (Figure I.4.E). Ainsi, les poids-lourds diesel émettent 8 % des PM_{2,5}, associés aux voitures personnelles diesel catalysées qui en émettent 5,5 % et aux véhicules utilitaires diesel catalysés qui contribuent aux émissions de PM_{2,5} à hauteur de 2,8 % (CITEPA, 2012).

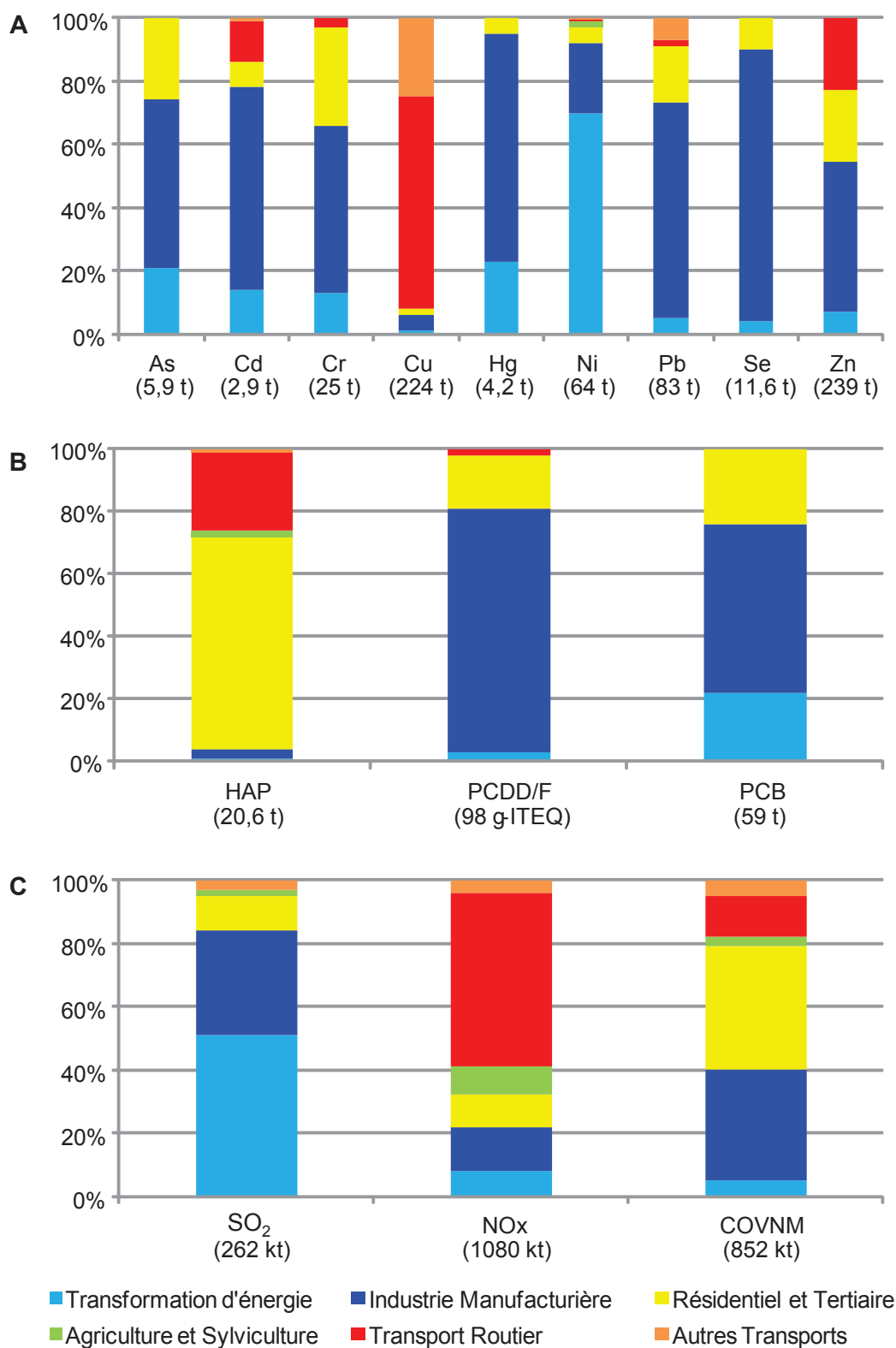


Figure I.6 : Répartition par secteur d'activité des émissions de métaux (A), polluants organiques persistants (B) et précurseurs de particules secondaires (C) en France métropolitaine en 2010 (données : CITEPA, 2012).

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.

1.3.2.4. Agriculture et sylviculture

Les particules issues de l'agriculture sont majoritairement liées au labourage des sols. Ce sont donc en grande majorité des particules grossières, de même composition que les particules terrigènes.

1.3.2.5. Combustion et métaux lourds

Indépendamment du secteur, les processus de combustion sont à l'origine de l'émission de métaux lourds qui peuvent constituer une partie des PM_{2.5}. Les types de métaux émis dépendent du combustible :

- la combustion de fioul lourd émet de l'arsenic, du cadmium et du sélénium, de grandes quantités de nickel, ainsi que de faibles quantités de chrome,
- l'utilisation de combustibles minéraux solides (houille, lignite, coke et agglomérés) est responsable du rejet d'arsenic, de cadmium et de petites quantités de chrome,
- la combustion de biomasse conduit à l'émission de cadmium, plomb, sélénium, zinc et de faibles quantités de chrome,
- l'incinération des déchets produit entre autres du cadmium, du mercure et du zinc,
- la combustion d'huiles de moteur engendre quant à elle l'émission de cadmium, chrome, cuivre et zinc (CITEPA, 2012).

1.3.3. Sources de polluants organiques persistants

Les activités humaines sont également responsables du rejet d'un certain nombre de composés organiques, qui pourront entrer dans la composition de particules primaires ou secondaires. Parmi ces composés se trouvent des Polluants Organiques Persistants (POP), tels que les HAP, les PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines (PCDD) et PolyChloroDibenzo-Furanes (PCDF), les PolyChloroBiphényles (PCB), ou encore certains pesticides. Ces familles de composés chimiques font partie des substances jugées préoccupante pour l'environnement et dont les rejets doivent être réduits par l'application de l'action 5 du PNSE 2.

1.3.3.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAP sont des composés organiques semi-volatils résultant d'une combustion incomplète. Ils peuvent être retrouvés dans la phase gazeuse des aérosols ou dans les particules atmosphériques (Allen *et al.*, 1996; Thrane and Mikalsen, 1981; Venkataraman and Friedlander, 1994). Il semble qu'ils soient initialement émis sous forme de gaz, mais

qu'ils se condensent presque instantanément sur les particules à température ambiante (Gustafson and Dickhut, 1997). Dans l'atmosphère, l'équilibre gaz-particule des HAP est déterminée par leur taux d'adsorption sur les suies (Dachs and Eisenreich, 2000; Vardar *et al.*, 2004).

Les HAP sont en majorité retrouvés dans la fraction fine des particules atmosphériques (Shen *et al.*, in press; Wu *et al.*, 2006). De plus, il apparaît que la classe granulométrique de particules à laquelle les HAP sont associés dépend de leur masse molaire. Ainsi, les HAP dont la masse molaire est comprise entre 178 et 202 g.mol⁻¹ se répartissent équitablement entre les PM₂ et les PM_{>2}, alors que les HAP dont la masse molaire est supérieure à 228 g.mol⁻¹ sont préférentiellement retrouvés dans les particules les plus fines (Allen *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2006).

Les HAP les plus fréquemment mesurés dans les particules sont le naphthalène, le pyrène, le benzo[ghi]pérylène, le chrysène, le benzo[a]anthracène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, l'indéno[1,2,3-cd]pyrène, le B[a]P et le dibenzo[ah]anthracène (Billet *et al.*, 2008; Sienna *et al.*, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006). Différentes caractéristiques de ces 10 HAP sont reprises dans le Tableau I.4.

Ces HAP n'ont cependant pas tous la même toxicité. Un modèle d'équivalence toxique, basé sur la cancérogénicité du B[a]P, a donc été développé (Brown *et al.*, 2005). Les Benzo[a]pyrène - Carcinogenic Equivalence Concentration (B[a]P-CEC) ainsi calculées permettent de prendre en compte la toxicité relative des différents HAP par rapport au B[a]P, dont la valeur a été fixée à 1.

Les HAP étant produits lors de la combustion incomplète de matière organique, ils sont majoritairement émis par le secteur résidentiel et tertiaire, essentiellement via le chauffage au bois. Les véhicules automobiles, et particulièrement les véhicules diesel, sont eux aussi une source importante de HAP (CITEPA, 2012) (Figure I.6.B). Les HAP émis dans l'atmosphère peuvent également, suite à des réactions chimiques avec l'oxygène et l'ozone atmosphériques, être transformés en nitro-HAP (Finlayson-Pitts and Pitts, 1997).

1.3.3.2. Polychlorodibenzo-*p*-dioxines et furanes

Les PCDD et PCDF (PCDD/F) sont regroupés classiquement sous le nom de dioxines. Ce sont des composés aromatiques tricycliques, possédant de 1 à 8 atomes de chlore. La différence entre les PCDD et les PCDF réside dans le nombre d'atomes d'oxygène contenus

HAP	Nb cycles aromatiques	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	B[a]P-CEC
Naphtalène	2	128	0,001
Pyrène	4	202	0,001
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène	5	276	0,01
Chrysène	4	228	0,01
Benzo[<i>a</i>]anthracène	4	228	0,1
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	5	252	0,1
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	5	252	0,1
Indeno[123 <i>cd</i>]pyrène	6	276	0,1
Benzo[<i>a</i>]pyrène	5	252	1
Dibenzo[<i>ah</i>]anthracène	5	278	5

Tableau I.4 : Caractéristiques des Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques (HAP) les plus fréquemment retrouvés dans les particules.

B[a]P-CEC : Benzo[*a*]Pyrène - Carcinogenic Equivalence Concentration (Brown et al., 2005).

dans le cycle central, à savoir 2 pour les PCDD contre 1 pour les PCDF. Les PCDD/F sont semi-volatils, très lipophiles et très résistants à la dégradation (Koester and Hites, 1992).

Les composés les plus toxiques sont ceux présentant des atomes de chlore au moins en position 2, 3, 7 et 8, de manière analogue à la 2,3,7,8-TétraChloroDibenzo-*p*-Dioxine (TCDD), composé le plus toxique également connu sous le nom de dioxine de Seveso. Ils sont au nombre de 17 parmi les 210 congénères possibles (75 PCDD et 135 PCDF) (OMS, 2003).

Les quantités de PCDD/F ne sont généralement pas exprimées sous la forme de concentration massique, mais en gramme (ou unité dérivée)- équivalent toxique international (ITEQ). Cette unité permet de prendre en compte la toxicité relative des congénères présents par rapport à la TCDD, dont la valeur a été fixée à 1.

Les PCDD/F peuvent se former au cours de tous les processus de combustion, mais sont principalement produits lors de l'incinération des déchets (42 %) et la production d'aggloméré par les hauts-fourneaux (29 %), d'où la prépondérance du secteur industriel dans leur émission (Figure I.6.B). Les arrêtés du 25 janvier 1991 et du 20 septembre 2002 relatifs à l'incinération des déchets non-dangereux ont permis une réduction de 99,9 % des émissions de PCDD/F des incinérateurs d'ordures ménagères, soit 1 200 g-ITEQ de moins, entre 1990 et 2010 (CITEPA, 2012).

1.3.3.3. Polychlorobiphényles

Les PCB ont historiquement été utilisés dans les transformateurs électriques et les condensateurs pour leurs propriétés isolantes. Ce sont des composés constitués de deux cycles benzéniques reliés entre eux, et dont tout ou partie des atomes d'hydrogène a été substitué par un atome de chlore.

Ce type de composé n'existe pas à l'état naturel, mais tous les compartiments de l'environnement sont contaminés par les PCB. Ceci est vraisemblablement dû à un relargage de PCB par de grandes étendues d'eau préalablement contaminées, telles que les grands lacs canadiens ou la mer Baltique (OMS, 2003).

Les PCB sont des molécules semi-volatiles, résistantes à la dégradation et lipophiles. Bien que 209 congénères soient théoriquement possibles, seuls 130 ont été identifiés. Les PCB dioxin-like (DL-PCB) sont généralement distingués des autres PCB. Les DL-PCB ont, de par leur structure proche de la TCDD, des mécanismes d'action toxique similaires. Parmi eux, 12 congénères se sont vu attribuer des facteurs d'équivalence toxique (Toxic

Equivalency Factors - TEF) selon le schéma proposé pour les dioxines par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (VandenBerg *et al.*, 1998). A l'inverse, les autres PCB, appelés PCB marqueurs, ne sont que très peu caractérisés d'un point de vue toxicologique.

La fabrication et l'utilisation de PCB ont été interdites en France à partir de 1987. Depuis, les PCB produits par les activités humaines sont, comme les PCDD/F, des sous-produits indésirables de combustion dans des conditions particulières. Ils sont ainsi générés lors de la combustion de biomasse, de l'incinération des déchets et par les aciéries électriques (CITEPA, 2012). Ils sont ainsi majoritairement émis par le secteur industriel (Figure I.6.B).

1.3.4. Sources de précurseurs de particules secondaires

Les aérosols secondaires sont majoritairement formés de sulfates, de nitrates et de carbone organique. Ces particules se forment dans l'atmosphère à partir de précurseurs gazeux, par conversion de gaz en particules ou par condensation de gaz sur des particules préexistantes (Figure I.7). Ainsi, les sulfates sont produits par oxydation en H_2SO_4 de gaz soufrés (e.g. SO_2 , H_2S , $(CH_3)_2S$), les nitrates proviennent des oxydes d'azote (NO_x) et les particules organiques secondaires peuvent être formées à partir de Composés Organiques Volatils Non-Méthaniques (COVNM) et de POP.

1.3.4.1. Gaz soufrés

Les émissions de dioxyde de soufre (SO_2) anthropique sont estimées à 262 kt en France métropolitaine pour l'année 2010. Il a pour origine essentielle l'utilisation de combustibles fossiles soufrés, tels que le charbon, le lignite, le coke de pétrole, le fioul lourd ou le gazole. Tous les secteurs utilisant ces combustibles sont donc émetteurs de SO_2 . A cette source s'ajoutent quelques procédés industriels générant des oxydes de soufre. Le premier sous-secteur émetteur de SO_2 est la production d'électricité (23 %), suivie par le raffinage du pétrole (22 %), la chimie (9,6 %), l'utilisation de minéraux non-métalliques et matériaux de construction (9,4 %) et la métallurgie (7,2 %) (CITEPA, 2012). La transformation d'énergie et l'industrie manufacturière sont ainsi les premiers émetteurs de SO_2 (Figure I.6.C).

En plus de ces sources anthropiques, des composés soufrés sont émis par différentes sources naturelles. Ce sont ainsi 1 100 kt de soufre, tous composés confondus, qui sont émis naturellement chaque année en Europe (Simpson *et al.*, 1999). En premier lieu les volcans, qui émettent des quantités variables de SO_2 en fonction du type de volcan et de sa température. Ainsi, des concentrations allant de 0,5 à 11,8 % (v/v) de SO_2 ont pu être

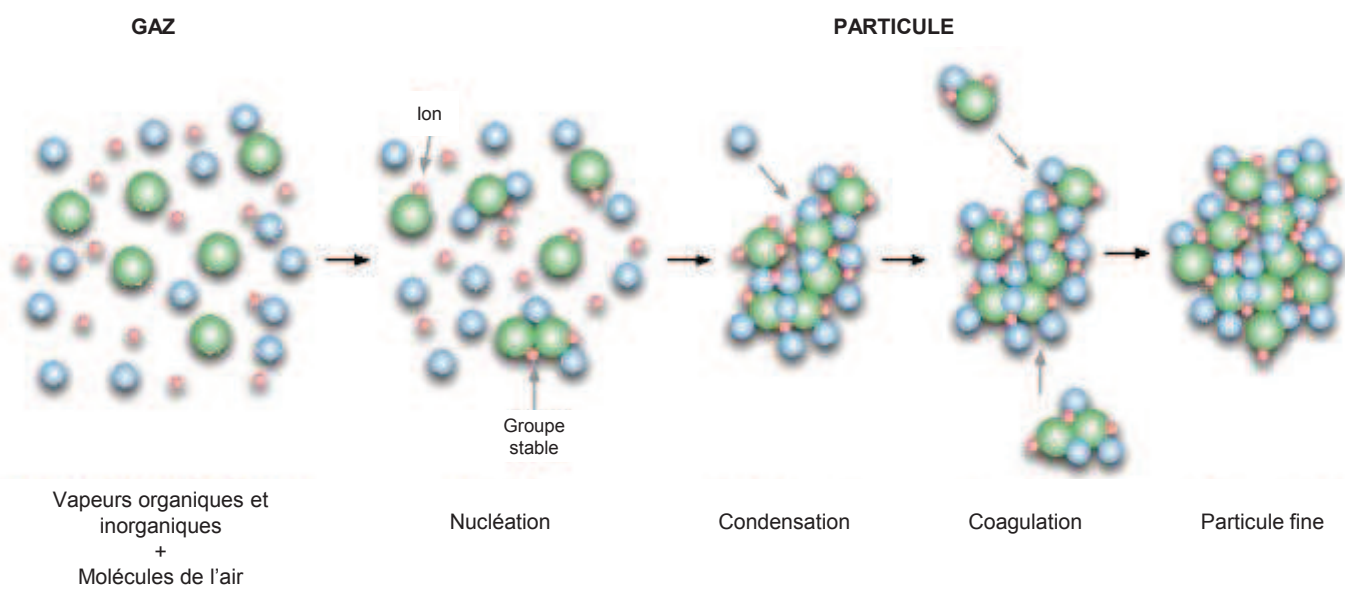


Figure I.7 : Mécanismes de formation des particules secondaires (adapté de Boulon, 2011).

mesurées dans des gaz volcaniques. De faibles quantités de H₂S, comprises entre 0,04 et 0,23 % (v/v), ont également été mesurées. La concentration en SO₂ est plus importante dans les fumées émises par les volcans de type « point-chaud » qui ont les températures les plus élevées (Symonds *et al.*, 1994). D'un point de vue global, les estimations disponibles font état d'émissions mondiales de SO₂ par les volcans comprises entre 13 000 et 21 000 kt par an (Andres and Kasgnoc, 1998; Halmer *et al.*, 2002). Le diméthylsulfure ((CH₃)₂S) est le composé soufré d'origine biologique le plus abondamment émis dans l'atmosphère (Simpson *et al.*, 1999). Il est principalement produit par le phytoplancton océanique, donnant lieu à des concentrations dans l'atmosphère océanique allant de 18 ng(S) / m³ en moyenne au niveau équatorial, à 73 ng(S) / m³ en moyenne au niveau des pôles (Davison *et al.*, 1996).

1.3.4.2. Oxydes d'azote

Dans un contexte d'étude de la pollution atmosphérique, le terme NO_x désigne les deux oxydes d'azote étudiés par les réseaux de surveillance de la qualité de l'air qui sont le dioxyde d'azote (NO₂) et le monoxyde d'azote (NO).

Les rejets de NO_x par les activités humaines sont estimés à 1 080 kt pour l'année 2010 en France métropolitaine. Ces deux composés sont principalement formés lors des processus de combustion, mais également au cours de quelques procédés industriels. La principale source anthropique de NO_x est ainsi le transport routier, responsable de 55 % des émissions (Figure I.6.C). L'industrie est quant à elle responsable de l'émission de 14 % des NO_x, essentiellement via le secteur de la chimie et celui des minéraux non-métalliques et matériaux de construction. Les secteurs résidentiel et tertiaire, d'une part, et agriculture et sylviculture, d'autre part, sont eux respectivement à l'origine de 10 % et 9 % des NO_x. Les NO_x émis par le secteur résidentiel proviennent des équipements de chauffage fonctionnant au gaz naturel, au fioul et au bois. Dans le cas de l'agriculture, les NO_x sont générés par la combustion de produits pétroliers (CITEPA, 2012).

En ce qui concerne les NO_x naturels, leur niveau d'émission est extrêmement variable et compris entre 140 et 1 500 kt d'azote par an en Europe (Simpson *et al.*, 1999). Au niveau mondial, les émissions biologiques de NO_x seraient d'environ 20 000 kt par an (Li *et al.*, 1999). Parmi ces 20 000 kt, la moitié serait issue de l'activité des bactéries nitrifiantes du sol (Levine *et al.*, 1984). Les émissions de NO lors de la transpiration du sol sont proportionnelles à la température et la quantité d'eau contenue dans la sol (Roelle *et al.*, 2001). Des NO_x peuvent également être formés au cours des orages, par une recombinaison des atomes d'oxygène et d'azote atmosphériques grâce à l'énergie provenant de l'activité électrique des éclairs.

1.3.4.3. Composés organiques volatils non-méthaniques

La famille des Composés Organiques Volatils (COV) regroupe plusieurs milliers de composés de composition et de structure variables. Selon la définition du Conseil Européen est un COV « *tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières* », étant précisé par ailleurs que le terme composé organique désigne « *tout composé contenant au moins l'élément carbone et un ou plusieurs des éléments suivants : hydrogène, halogènes, oxygène, soufre, phosphore, silicium ou azote, à l'exception des oxydes de carbone et des carbonates et bicarbonates inorganiques* » (directive 1999/13/CE du 11/03/99). Les membres de cette famille ont pour point commun de se trouver sous forme de vapeur dans l'atmosphère. Le méthane est un COV présent naturellement dans l'atmosphère, qui est donc distingué des autres COV par l'emploi du terme de COVNM.

Les estimations d'émission de COVNM en France métropolitaine pour l'année 2010 sont fixées à 852 kt. Cette famille de composés étant extrêmement vaste, les COVNM peuvent avoir de nombreuses sources. Ainsi, le secteur résidentiel et tertiaire émet 39 % des COVNM, principalement par l'utilisation de solvants tels que les peintures et les colles, et par la combustion de bois dans les petits équipements domestiques. L'industrie est quant à elle à l'origine de 35 % des émissions, essentiellement à cause de l'utilisation de peintures (CITEPA, 2012) (Figure I.6.C).

Les principales sources naturelles de particules organiques secondaires sont les zones fortement végétalisées. En effet, les plantes vasculaires émettent une grande variété de terpènes volatils, dont les plus courants sont l'isoprène (C_5H_8) et les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) (Harrison *et al.*, 2001). L'oxydation de ces monoterpènes conduit à la formation de nouvelles particules par des phénomènes de nucléation (Koch *et al.*, 2000). L'émission de COV d'origine biologique a été estimée entre 500 000 et 825 000 kt par an au niveau mondial (Fehsenfeld *et al.*, 1992). Parmi ces émissions, 13 000 kt / an sont attribuées à des sources européennes (Simpson *et al.*, 1999). Les émissions biotiques de COVNM en France métropolitaine en 2010 seraient comprises entre 1 273 à 1 734 kt (CITEPA, 2012). Il convient cependant de signaler la grande variabilité saisonnière des émissions biologiques de COVNM (Figure I.8).

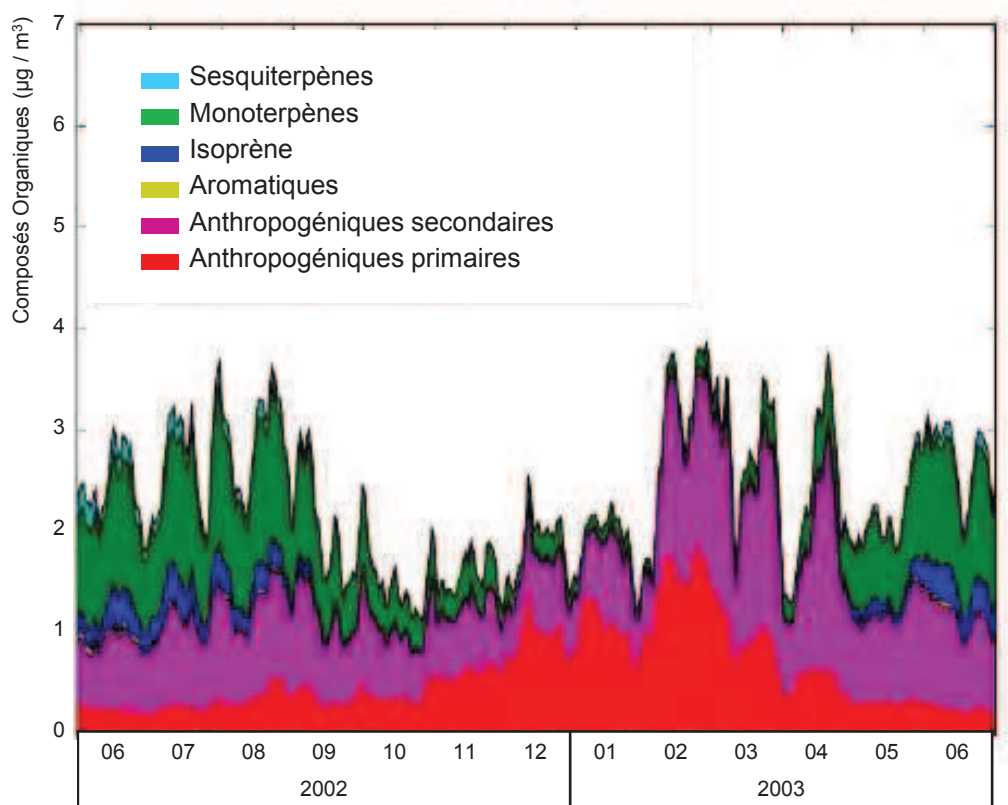


Figure I.8 : Evolution temporelle des contributions biologiques et anthropiques aux aérosols organiques secondaires (d'après Couvidat *et al.*, 2012).

1.4. Contexte local : l'agglomération de Dunkerque

Comme nous venons de le voir, les sources anthropiques de polluants atmosphériques, et notamment de particules, sont nombreuses. Certaines zones qualifiées de « points noirs environnementaux » concentrent ces rejets, donnant lieu à des inégalités environnementales que le PNSE 2 vise à réduire.

La pollution de l'environnement représente ainsi un enjeu majeur pour la région Nord - Pas de Calais, qui regroupe 13,6 % des sites pollués recensés en France en 2007 et détient le 1^{er} rang des régions pour la mortalité par maladie de l'appareil respiratoire, le 2^{ème} rang des régions en émissions de dioxines, le 3^{ème} rang des régions en émissions de particules fines. Ce sont ainsi 549 des 4 029 sites français pollués qui se situent dans la région, dont 420 pour le seul département du Nord.

Il existe cependant des inégalités environnementales au sein même de la région, car certaines « zones prioritaires », telles que l'agglomération de Dunkerque, concentrent un grand nombre de sites polluants en activité.

1.4.1. Données démographiques, géographiques et économiques

Selon les données 2009 de l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), 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, 2009). Cette zone urbaine, constituant le troisième port de France, est caractérisée par une forte présence industrielle et, de part sa localisation à l'interface France - Belgique - Royaume-Uni, deux autoroutes très fortement fréquentées (A16 et A25) (Figure I.9.A).

1.4.1.1. 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 I.9.B). Quatorze d'entre eux sont classés sites Seveso de haut seuil (MEDDE, 2013) et un 15^{ème} (terminal méthanier) est en cours de construction :

- Air Liquide France Industrie (Société des Gaz Industriels de France),
- Aluminium Dunkerque,
- Appontements Pétroliers des Flandres Dépôt (Groupe TOTAL),
- Arcelor Mittal Dunkerque,

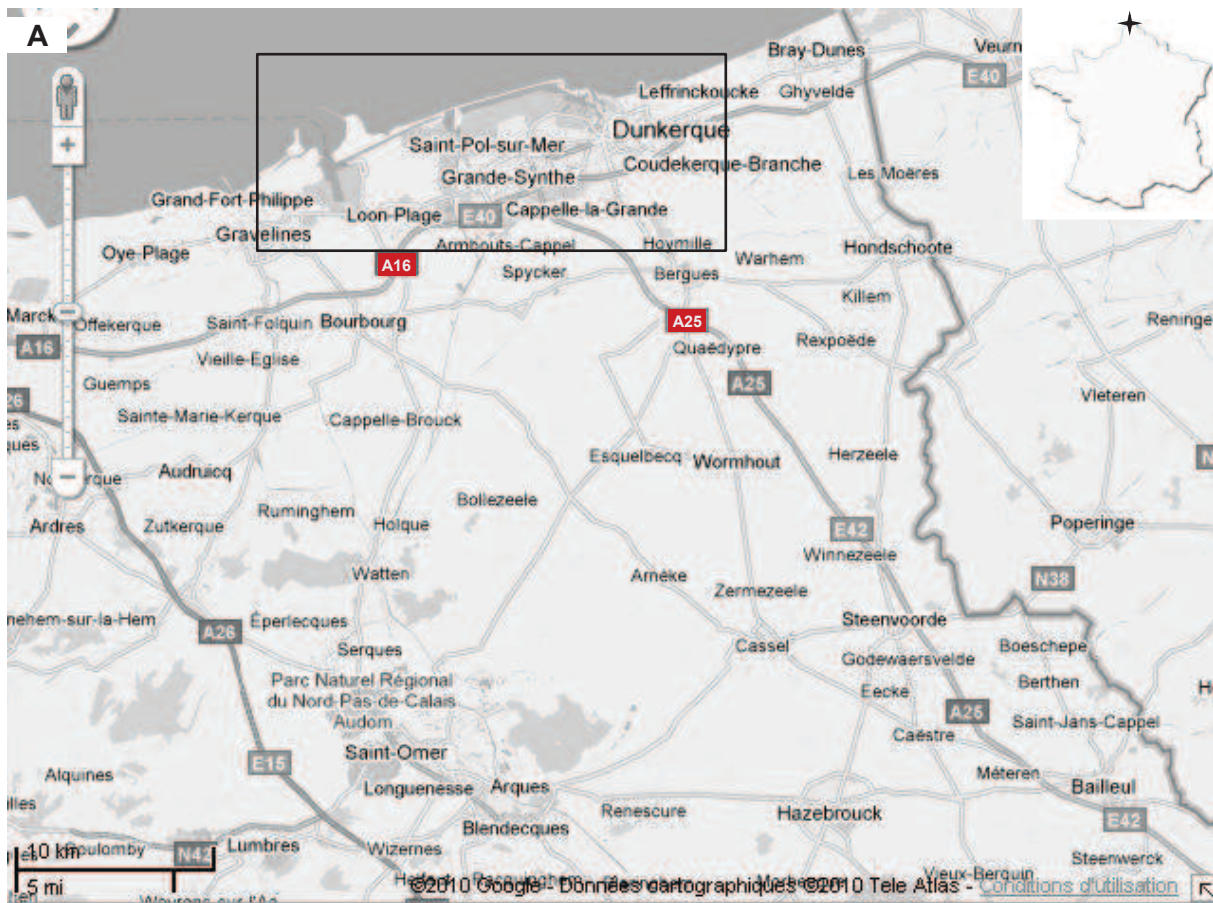


Figure I.9 : Localisation de l'agglomération de Dunkerque (A) et des sites industriels (B) (Cartes GoogleMaps).

- BASF AgriProduction,
- Dépôts de Pétrole Côtiers,
- MINAKEM SA
- Polimeri Europa France (sites Dunes)
- Polimeri Europa France (sites Fortelet),
- Rubis Terminal Mole V,
- Rubis Terminal Unican,
- Ryssen Alcools SAS,
- Société de la Raffinerie de Dunkerque,
- TOTAL Raffinage France SA.

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.

1.4.1.2. Emploi industriel à Dunkerque

Grâce à ce tissu industriel d'une remarquable densité, l'emploi industriel représentait, en 2007, 30,1 % des emplois du territoire (Figure I.10). Le premier secteur en termes de nombre d'emploi est la métallurgie et la transformation de métaux. En effet, la région de Dunkerque regroupe près de 80 % de la sidérurgie nationale, principalement par la présence du groupe Arcelor Mittal qui concentre à lui seul 4 527 postes, soit 6,8 % des emplois salariés de la zone. Le second pôle d'activité du dunkerquois est le secteur de l'énergie, représenté par la centrale nucléaire de Gravelines, la raffinerie des Flandres et la raffinerie de Dunkerque. D'après les données de la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL), ces entreprises employaient en 2007 respectivement 1 615, 392 et 253 personnes, soit 2,4 %, 0,6 % et 0,4 % des travailleurs (DREAL, 2009). Ces chiffres seraient cependant à reconsidérer au vu des fortes baisses d'activités enregistrées depuis leur publication. Néanmoins, l'industrie demeure le premier employeur de la région dunkerquoise et lui permet de bénéficier de 12,4 % de cadres supplémentaires dans l'industrie en comparaison avec la moyenne régionale, d'après les chiffres des Déclarations Annuelles des Données Sociales 2006 (INSEE, 2006).

1.4.2. 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).

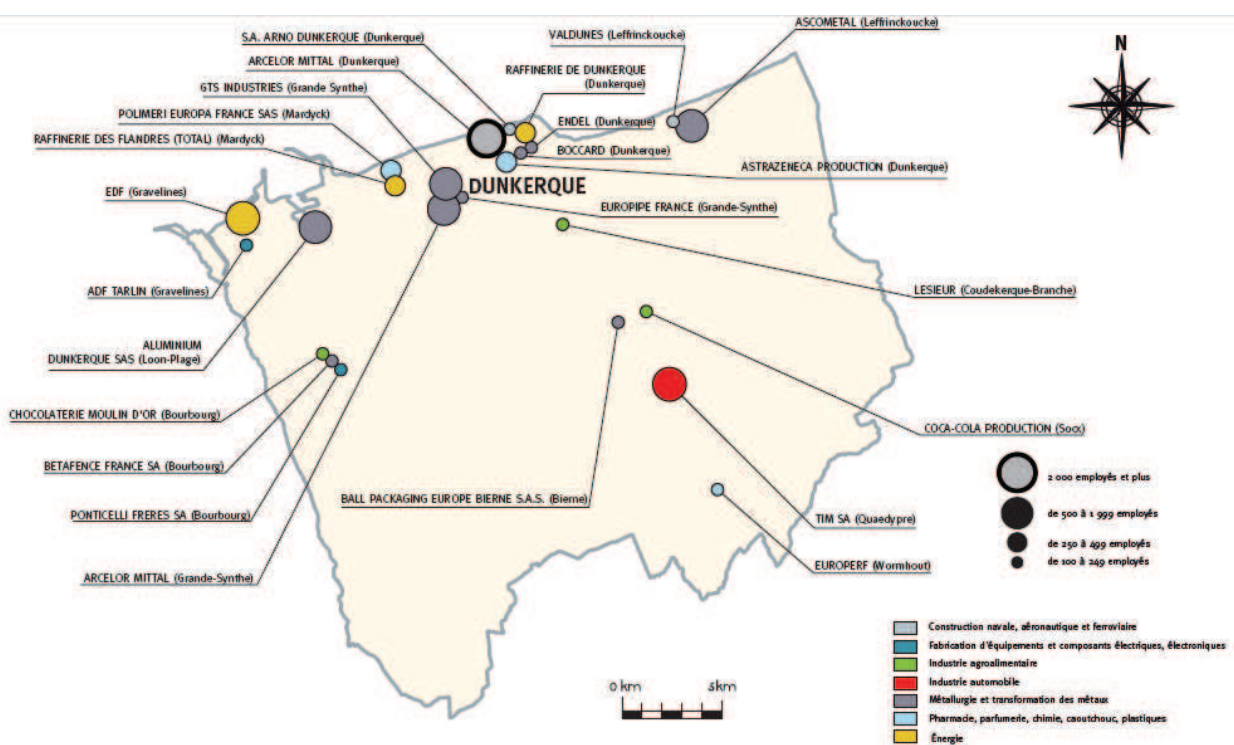


Figure I.10 : Principaux employeurs industriels de la zone d'emploi de Dunkerque (DREAL, 2009).

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, 2010). Parmi ces installations, un centre de valorisation énergétique se situe à proximité de la ville (Figure I.9.B).

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-EMD, 2006) (Figure I.11).

1.4.2.1. 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 I.11.A). 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 I.11.B). 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 I.11.C).

A l'inverse, les émissions de CO₂ et de COVNM sont équivalentes à celles mesurées dans d'autres zones urbaines de la région Nord - Pas de Calais (Figures I.11.D,E).

1.4.2.2. Plomb

Un profil similaire à celui observé pour le SO₂ est retrouvé pour les émissions de plomb, qui sont supérieures à 680 kg / km² / an au niveau de la zone industrialo-portuaire de Dunkerque (Figure I.11.F). Le territoire dunkerquois regroupe la moitié des émetteurs régionaux de plus de 100 kg / an de plomb, dont le site Arcelor Mittal qui a généré à lui seul 6 261 kg de plomb en 2009 (DREAL, 2010).

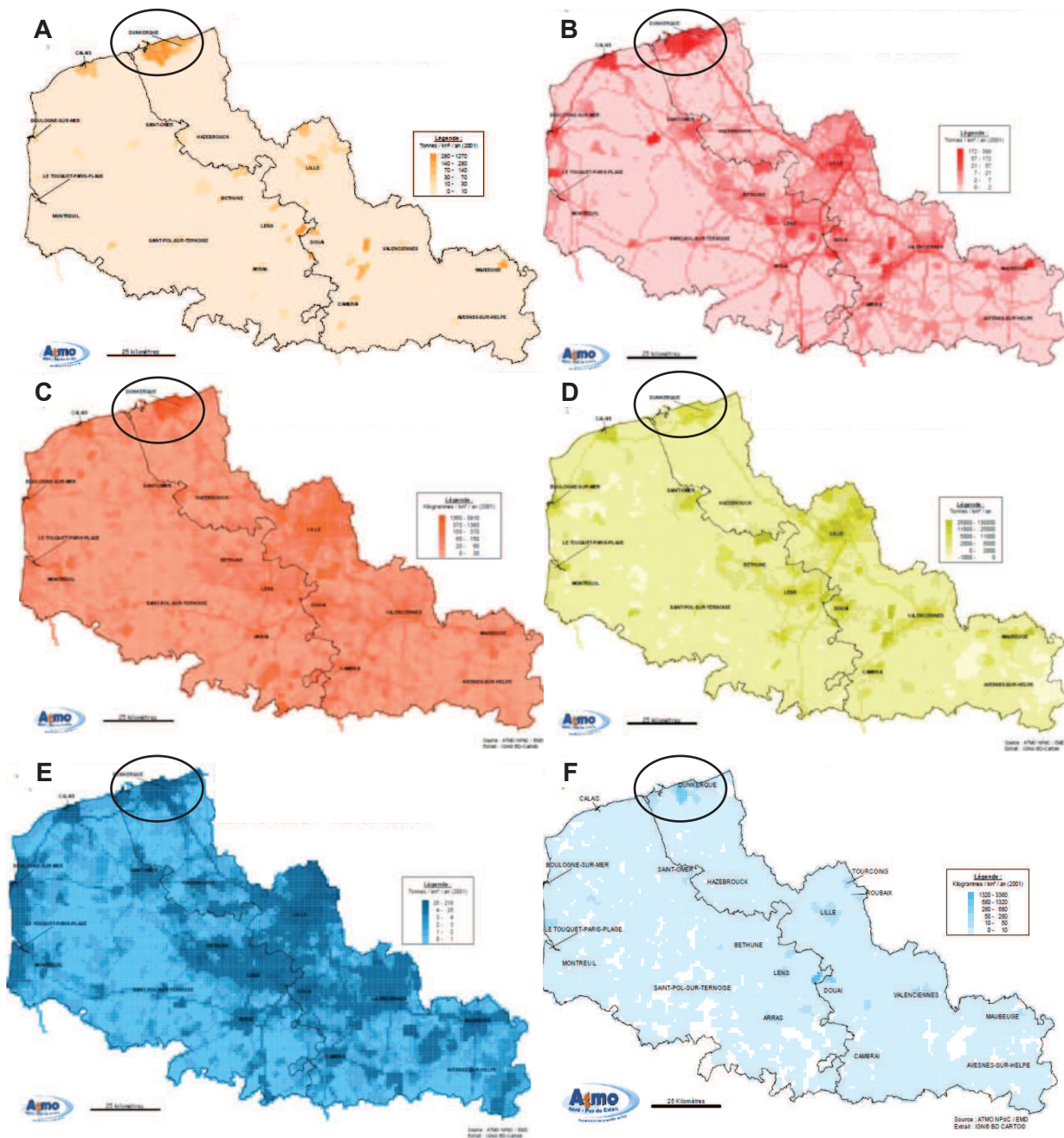


Figure I.11 : Répartition dans la région Nord-Pas-de-Calais des émissions atmosphériques en SO₂ (A), oxydes d'azote (B), benzène (C), CO₂ (D), composés organiques volatils non-méthaniques (E) et plomb (F) (ATMO-EMD, 2006).

1.4.2.3. Emissions de particules

En plus des polluants précédemment décrits, il convient de prendre en compte les quantités de particules en suspension dans l'atmosphère, et notamment de particules fines $PM_{2.5}$. En effet, les $PM_{2.5}$ représentent un véritable problème de santé publique en ayant un impact à long terme très important sur la santé des populations exposées. A titre d'exemple, l'étude Aphekom récemment publiée estime que 4 à 5 mois d'espérance de vie à 30 ans pourraient être gagnés si les concentrations en particules fines dans l'atmosphère étaient réduites de $5 \mu\text{g} / \text{m}^3$. De plus, cette étude évalue que le niveau en $PM_{2.5}$ actuellement supérieur à la valeur cible de l'OMS ($10 \mu\text{g} / \text{m}^3$) dans 9 grandes villes françaises aurait un impact économique compris entre 3 et 12 milliards d'euros (Declercq *et al.*, 2012). Ces différents éléments expliquent l'aspect prioritaire donné à la réduction des émissions de $PM_{2.5}$ dans le PNSE 2 à travers le plan « Particules ».

L'étude de la répartition des émissions en particules au niveau régional montre que seule la région de Dunkerque comprend des zones émettant plus de 29 t de particules / km^2 / an, avec au minimum des émissions de 4 t / km^2 / an (Figure I.12.A). L'analyse des principaux secteurs responsables de ces émissions met en évidence le rôle prépondérant joué par les activités industrielles au niveau dunkerquois (Figure I.12.B). 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.

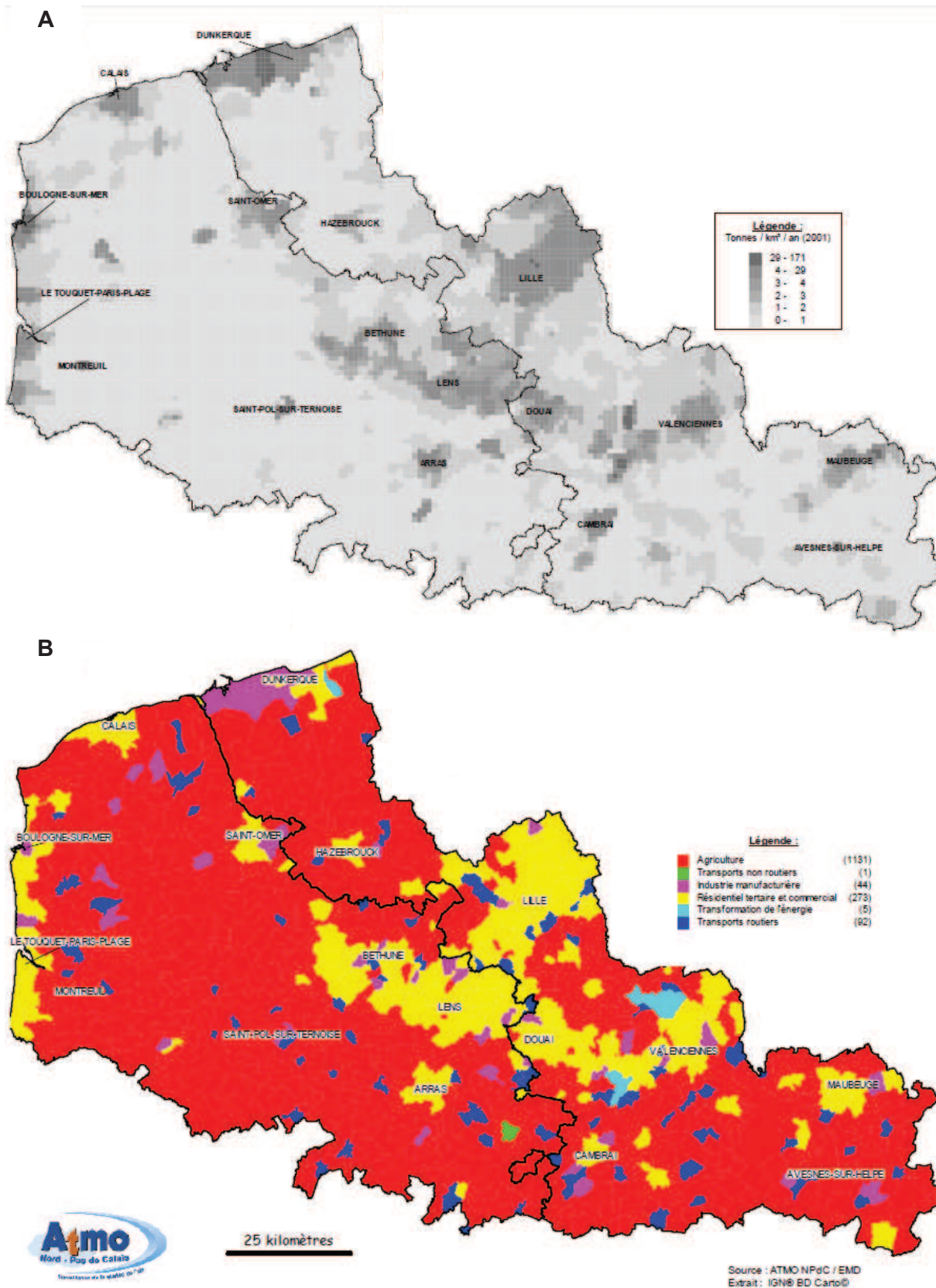


Figure I.12 : Répartition dans la région Nord-Pas de Calais des émissions atmosphériques de particules en suspension tous secteurs confondus (A) et secteur majoritairement responsable des émissions de particules par commune (B) (ATMO-EMD, 2006).

Les particules atmosphériques présentent donc une grande diversité, tant du point de vue de leurs caractéristiques physiques que chimiques. Ces propriétés sont conditionnées par leur sources d'émission, qui peuvent être naturelles ou anthropiques et sont parfois concentrées dans des zones qualifiées de « points noirs environnementaux ». L'appareil respiratoire constitue logiquement la principale voie d'exposition à ces particules atmosphériques, qui sont, selon de nombreuses études épidémiologiques, à l'origine de différentes pathologies cardio-respiratoires, dont des cancers broncho-pulmonaires (Hoffmann et al., 2009; Krewski et al., 2005; Kunzli et al., 2000; Pope et al., 2004, 2009).

2. PARTICULES ET CANCER BRONCHO-PULMONAIRE

➤ 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 de la physiologie respiratoire, afin de comprendre comment elles peuvent impacter la déposition et la rétention des particules, avant d'aborder la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

2.1. Physiologie de l'appareil respiratoire.....	26
2.1.1. Rappels anatomiques.....	26
2.1.1.1. Voies aériennes supérieures	26
2.1.1.2. Voies aériennes inférieures	27
2.1.1.3. Segmentation pulmonaire	28
2.1.2. Histologie et cytologie des voies respiratoires	28
2.1.2.1. Voies aériennes supérieures	28
2.1.2.2. Voies aériennes inférieures	29
2.1.3. Fonction des voies respiratoires	31
2.1.3.1. Voies aériennes supérieures	31
2.1.3.2. Voies aériennes inférieures	32
2.2. Déposition respiratoire et rétention des particules	33
2.2.1. Mécanismes de déposition des particules	33
2.2.2. Zone de déposition des particules selon leur taille	34
2.2.3. Paramètres individuels influençant la déposition des particules.....	34
2.2.3.1. Influence de l'âge	34
2.2.3.2. Influence du sexe	35
2.2.3.3. Influence des paramètres respiratoires	35
2.2.3.4. Influence de pathologies respiratoires	35
2.2.4. Rétention et clairance pulmonaire des particules	36
2.2.4.1. Clairance nasale	36
2.2.4.2. Clairance trachéo-bronchique.....	37
2.2.4.3. Clairance alvéolaire	37
2.3. Cancérogenèse broncho-pulmonaire	38
2.3.1. Classification histologique des cancers broncho-pulmonaires	38
2.3.1.1. Carcinomes pulmonaires non à petites cellules	38
2.3.1.2. Carcinomes pulmonaires à petites cellules	39
2.3.2. Propriétés des cellules cancéreuses.....	39
2.3.2.1. Indépendance des signaux de prolifération extérieurs	40
2.3.2.2. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs	40
2.3.2.3. Résistance à l'apoptose	40
2.3.2.4. Potentiel réplicatif illimité.....	41
2.3.2.5. Capacité d'angiogenèse	42
2.3.2.6. Capacité d'invasion et de diffusion métastatique.....	42
2.3.3. Evolution et altérations associées.....	42
2.3.3.1. Evolution histologique	43
2.3.3.2. Anomalies associées à la cancérogenèse.....	43

2.1. Physiologie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire regroupe l'ensemble des organes qui assurent la conduction de l'air jusqu'aux alvéoles et les échanges gazeux au niveau alvéolaire. Cet ensemble d'organes représente la plus grande interface d'échange avec l'air ambiant, soit 80 m² en contact avec les 15 m³ d'air inspirés chaque jour en moyenne par un individu adulte. L'importance de cette surface fait de l'appareil respiratoire la cible privilégiée des polluants présents au niveau atmosphérique.

Ce chapitre sera consacré à l'étude de l'anatomie et la physiologie de ce système complexe, afin de mieux comprendre les effets toxiques engendrés par la pollution atmosphérique particulaire.

2.1.1. Rappels anatomiques

L'appareil respiratoire peut être subdivisé en voies aériennes supérieures et inférieures, elles-mêmes composées de différents organes ayant une organisation tissulaire particulière et remplissant des fonctions spécifiques (Figure I.13). Les notions présentées ci-dessous sont, sauf mention contraire, adaptées des ouvrages de Quevauvillers et Préfaut (Préfaut, 1998; Quevauvillers, 2004).

2.1.1.1. Voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures sont constituées de trois éléments :

- les fosses nasales,
- le pharynx,
- le larynx.

Les fosses nasales constituent la première partie des voies respiratoires. Ce sont deux cavités séparées par un septum, qui démarrent par les narines au niveau antérieur et s'ouvrent sur le nasopharynx au niveau postérieur. Chaque fosse nasale comporte des cornets permettant de ralentir le flux d'air en créant des turbulences. Les fosses nasales sont constituées d'os dans leur partie supérieure et deviennent cartilagineuses au niveau de la pointe. A ces fosses nasales sont associées des cavités osseuses annexes appelées sinus, sans lien avec la respiration.

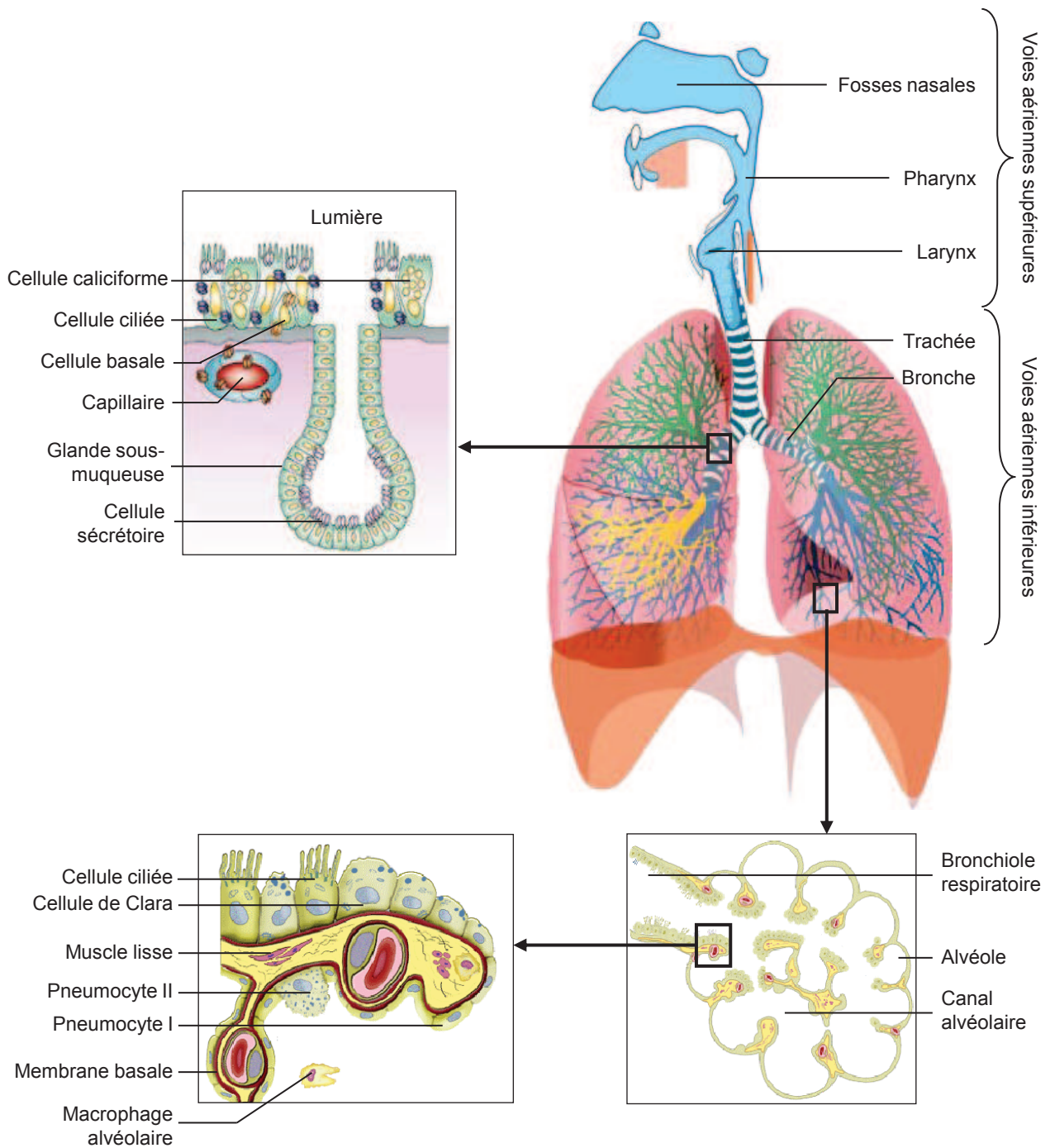


Figure I.13 : Structure de l'appareil respiratoire humain et organisation cellulaire.

Le pharynx est un conduit musculo-membraneux. Il est constitué de 3 segments : le nasopharynx (ou rhinopharynx), partie supérieure en rapport avec les fosses nasales, l'oropharynx, partie moyenne buccale, et l'hypopharynx, qui s'ouvre en avant sur le larynx.

Le larynx est un appareil musculo-cartilagineux rigide reliant le pharynx à la trachée, 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 mobile 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.

2.1.1.2. Voies aériennes inférieures

Les voies aériennes inférieures sont composées de différentes structures :

- la trachée,
- l'arbre bronchique,
- la zone d'échanges gazeux.

Elles sont extra-pulmonaires au niveau de la trachée et bronches souches, qui pénètrent dans les poumons au niveau du hile pour devenir intra-pulmonaires.

La trachée correspond à la génération 0 (G0) de l'arbre respiratoire. C'est un conduit cylindrique cartilagineux et membraneux d'environ 12 cm de long et 2 cm de diamètre. 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 (ou carina) dans sa partie inférieure. Elle est constituée de 16 à 20 anneaux cartilagineux incomplets, séparés entre eux par des dépressions constituées de tissu fibro-élastique.

L'arbre bronchique correspond aux divisions successives des voies respiratoires à partir de la bifurcation trachéale. Il regroupe donc la zone de conduction de l'appareil respiratoire comprise entre les bronches souches (G1) et les bronchioles terminales (G14). Les divisions à partir des bronches souches ne sont pas symétriques et leur morphologie est soumise à une grande variabilité interindividuelle. La ramification de l'arbre bronchique permet d'aboutir à des bronchioles de 0,15 cm de diamètre, puis à des bronchioles terminales de 0,07 cm de diamètre. La ramification des voies respiratoires est telle que, d'après le modèle IRCP, les bronchioles terminales seraient au nombre de 65 000 (IRCP, 1994).

La zone d'échanges gazeux est constituée des bronchioles respiratoires (G15-18), des canaux alvéolaires (G19-23) et des alvéoles (G24). Les bronchioles respiratoires sont au nombre de 260 000 par génération, alors que les alvéoles sont au nombre de 450 000 000 et représentent une surface qui varie, selon les estimations, de 80 à 140 m² (IRCP, 1994). La taille des alvéoles est estimée à 244 µm de diamètre et 238 µm de longueur.

2.1.1.3. Segmentation pulmonaire

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), alors que le poumon gauche ne comprend que les lobes supérieur et inférieur, séparés par la scissure oblique.

2.1.2. Histologie et cytologie des voies respiratoires

L'histologie de l'appareil respiratoire évolue selon la zone considérée (Tableau I.5). Ce chapitre sera donc consacré à la description de l'histologie des voies respiratoires, selon les régions anatomiques précédemment décrites.

2.1.2.1. Voies aériennes supérieures

La partie antérieure des fosses nasales, constituée par les narines, est tapissée de vibrisses qui filtrent l'air inspiré et agissent comme une barrière physique pour les éléments les plus gros.

Dans leur partie postérieure, les fosses nasales sont recouvertes d'une muqueuse respiratoire, très vascularisée et limitée par un épithélium pseudostratifié. Le tissu conjonctif sous-épithélial est riche en fibres élastiques et comporte des glandes tubuleuses séreuses, muqueuses, ou mixtes (Figure I.14.A). L'épithélium respiratoire est composé de cellules cylindriques ciliées, de cellules caliciformes et de petites cellules basales, permettant la régénération épithéliale (Figure I.14.B). La muqueuse respiratoire est recouverte d'un fin film de mucus, produit essentiellement par les glandes à mucus et, dans une moindre mesure, par les cellules caliciformes. Cette couche de mucus est organisée en deux phases : une couche superficielle visqueuse riche en glycosaminoglycanes, capable de piéger les poussières contenues dans l'air ambiant, et une couche profonde plus fluide, permettant le

	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 (musculeuse)		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				

Tableau I.5 : Eléments constituant la paroi des voies respiratoires en fonction de la zone considérée.

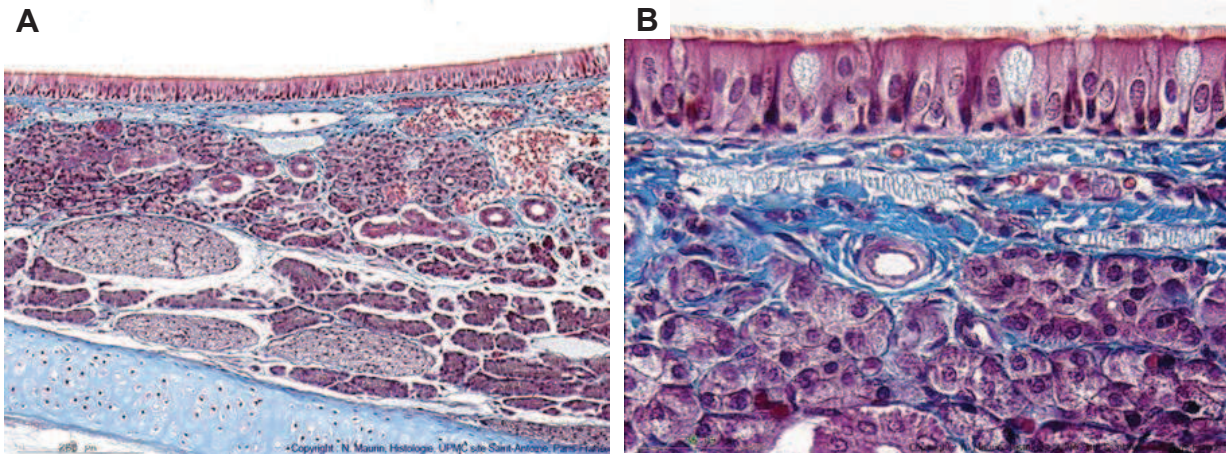


Figure I.14 : Coupes histologiques de septum nasal de lapin mettant en évidence le cartilage septal (A) et la muqueuse respiratoire (B). x100 (A) ; x400 (B) (UMPC, 2009).

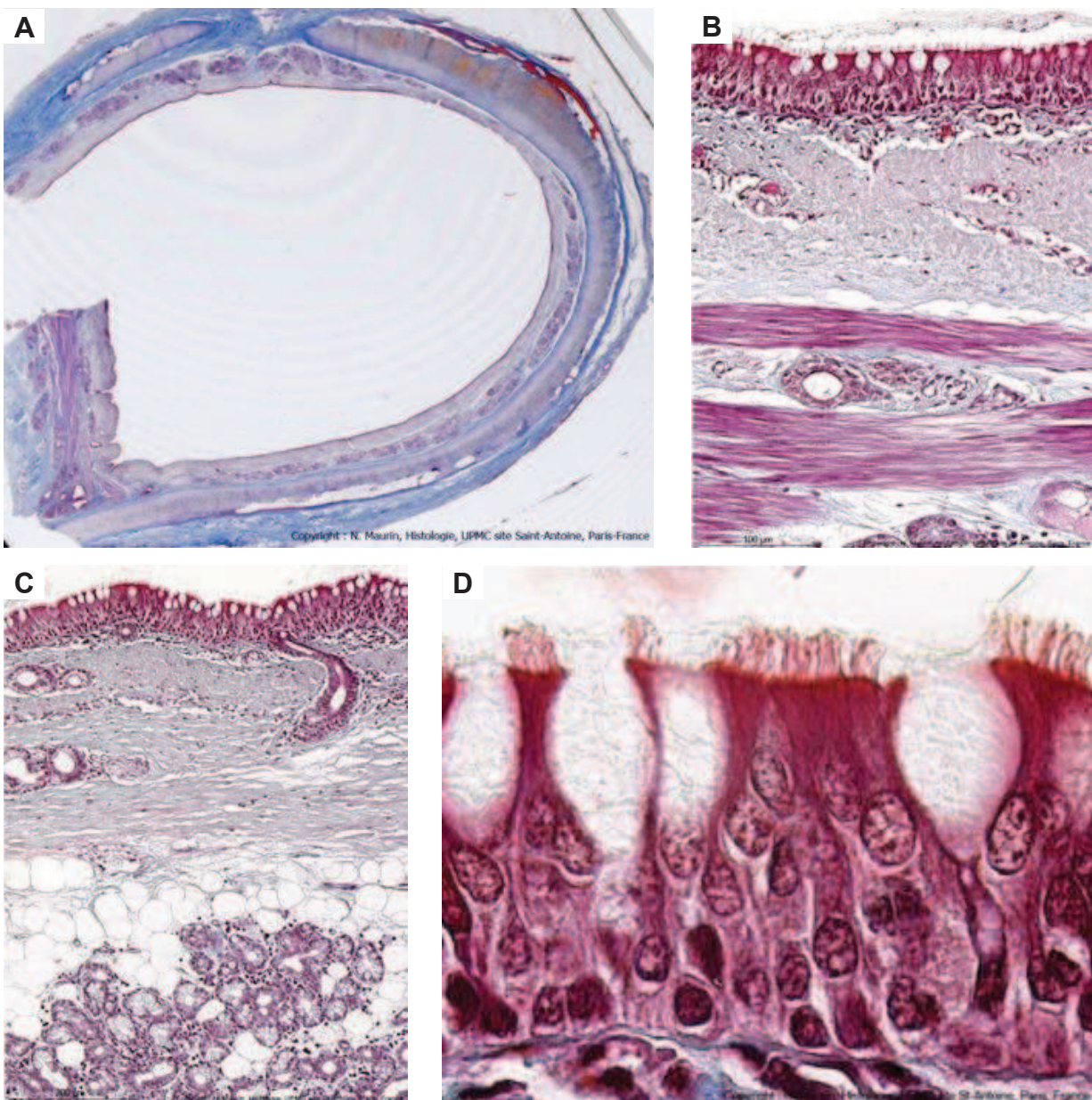


Figure I.15 : Coupes histologiques de trachée humaine (A) ou de porc (B-D), mettant en évidence l'organisation générale de la trachée (A), la muqueuse et le muscle trachéal au niveau postérieur (B), la muqueuse trachéale et le cartilage hyalin (C) et l'épithélium trachéal (D). lame scannée (A) ; x200 (B) ; x 100 (C) ; x1000 (D) (UMPC, 2009).

battement ciliaire. Le battement ciliaire permet le glissement de la couche superficielle vers le pharynx.

La partie postérieure des fosses nasales est quant à elle recouverte d'une muqueuse de type olfactif. Cette muqueuse est recouverte d'un épithélium pseudo-stratifié olfactif composé de cellules de soutien et de cellules nerveuses bipolaires olfactives. Les axones de ces cellules nerveuses se réunissent en filets olfactifs dans le chorion, avant de rejoindre le bulbe olfactif à travers les orifices de la lame criblée de l'éthmoïde.

La paroi du pharynx est constituée d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse inconstante et d'une musculature. L'épithélium bordant la muqueuse est variable selon la zone du pharynx considérée. Ainsi, le nasopharynx est bordé par un épithélium pseudostratifié de type respiratoire, comme le sont les fosses nasales dans leur partie postérieure. A l'inverse, l'oropharynx, dans le prolongement de la cavité buccale, est revêtu d'un épithélium pluristratifié épidermoïde. Enfin, l'épithélium retrouvé au niveau de l'hypopharynx est identique à celui observé dans l'oropharynx. Le chorion est quant à lui dense et riche en fibres élastiques, alors que la sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif dense. Enfin, la musculature est constituée de deux couches de muscle strié séparées par de nombreuses fibres élastiques.

Le larynx est constitué de cartilages recouverts par une muqueuse de type respiratoire. Les cartilages cricoïde et thyroïde sont de type hyalin et peuvent donc s'ossifier avec l'âge, contrairement à l'épiglotte qui est un cartilage de type élastique. La muqueuse laryngée est irrégulière et forme 4 replis, dont les deux du bas forment les « vraies » cordes vocales en opposition avec les « fausses » cordes vocales situées en haut. La muqueuse du larynx contient des glandes mixtes classées comme tubuleuses, pouvant être séreuses ou muqueuses. Elle est limitée par un épithélium pseudostratifié de type respiratoire. A noter cependant l'histologie particulière au niveau des vraies cordes vocales. En effet, l'épithélium y est de type pluristratifié épidermoïde et recouvre un chorion dépourvu de glandes mais renfermant une large bande de tissu élastique appelé ligament vocal.

2.1.2.2. Voies aériennes inférieures

La trachée est constituée d'anneaux incomplets de cartilage hyalin (Figure I.15.A), ayant une forme caractéristique de fer à cheval dont les extrémités sont reliées au niveau dorsal par le muscle trachéal (Figure I.15.B). Ces anneaux sont superposés et reliés entre eux par du tissu fibreux riche en fibres élastiques. La couche fibro-cartilagineuse est recouverte au niveau de la lumière par une muqueuse de type respiratoire (Figure I.15.C). Cette muqueuse est limitée par un épithélium pseudostratifié de type respiratoire (Figure I.15.D), contenant

des cellules ciliées, dont la proportion augmente en fonction de la hauteur dans la trachée, et des cellules caliciformes, qui peuvent se rassembler pour former des glandes intraépithéliales. Le chorion est très vascularisé, riche en fibres élastiques, et contient des glandes mixtes identiques à celles retrouvées au niveau du larynx. Au niveau externe, la trachée est constituée d'une couche conjonctive riche en tissu adipeux, vaisseaux et nerfs.

L'histologie des bronches se modifie au fur et à mesure des divisions bronchiques. Ainsi, les bronches souches ont, dans leur portion extra-pulmonaire, une organisation tissulaire proche de celle de la trachée (Figure I.16.A,B). Les deux points de divergence sont le diamètre inférieur des bronches souches et la présence d'anneaux cartilagineux complets.

Lorsque les bronches souches deviennent intra-pulmonaires, ces anneaux se fragmentent et les cellules musculaires lisses s'organisent en une musculature incomplète appelée muscle de Reissessen.

Les bronches lobaires conservent un épithélium pseudostratifié de type respiratoire, associé à des plaques de cartilage.

Au niveau des bronches segmentaires, l'épithélium devient cylindrique simple et cilié, et possède encore des cellules caliciformes. Les plaques de cartilage se transforment en nodules profonds de taille variable et le nombre de cellules musculaires lisses augmente. La diminution de la taille des nodules de cartilage et la raréfaction des cellules caliciformes se poursuivent au fur et à mesure des divisions bronchiques (Figure I.16.C,D).

L'épithélium devient cubique simple au niveau des bronchioles. Les nodules de cartilage et les glandes ont totalement disparu (Figure I.16.E). Le chorion ne contient donc plus qu'un petit nombre de cellules musculaires lisses et des fibres de collagène. L'épithélium contient des cellules de Clara, des cellules endocrines et quelques cellules possédant encore des cils courts. Les cellules de Clara sont caractérisées par leur pôle apical bombé qui fait saillie dans la lumière (Figure I.16.F). Ce sont des cellules sécrétrices et riches en cytochromes P450.

La structure de l'épithélium recouvrant les bronchioles terminales est identique. Celles-ci sont associées à une artériole pulmonaire et se divisent pour former les bronchioles respiratoires.

Les bronchioles respiratoires sont elles aussi limitées par un épithélium cubique contenant des cellules de Clara. Leur paroi ne contient plus que quelques fibres musculaires lisses. Elles se divisent en plusieurs canaux alvéolaires (Figure I.17.A).

Les canaux alvéolaires servent de point d'insertion aux sacs alvéolaires. Ils sont formés de fibres de collagène ou de fibres élastiques, associées à quelques cellules musculaires lisses. Ils sont recouverts d'un épithélium qui peut être cubique ou pavimenteux, en continuité avec l'épithélium alvéolaire.

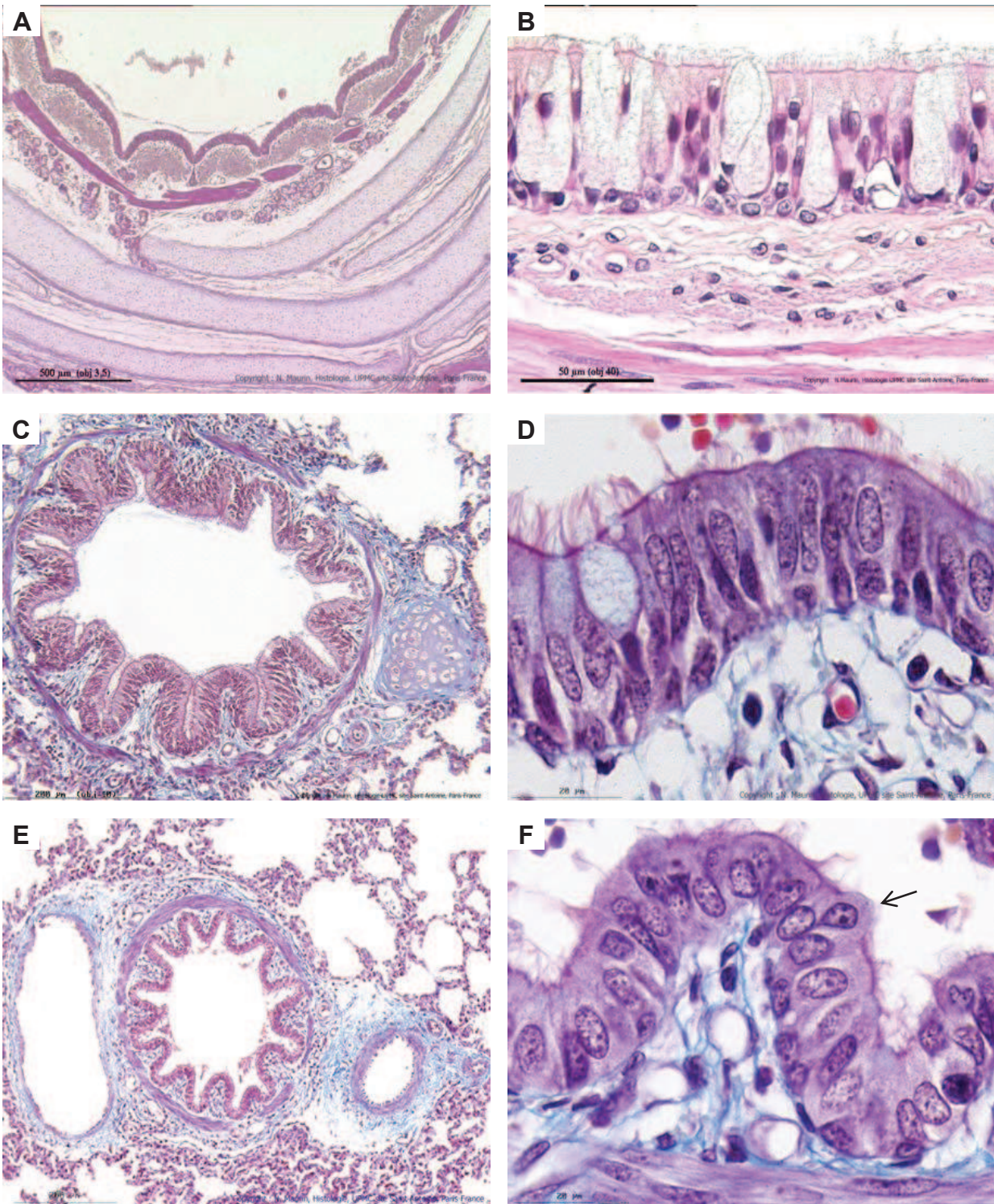


Figure I.16 : Coupes histologiques de bronches extra-pulmonaires (A,B), de bronches de petit calibre (C,D) et de bronchioles terminales (E,F) humaine (B), de porc (A,C,E,F) ou de chèvre (D), mettant en évidence l'organisation générale de la paroi bronchique (A,C,E), la muqueuse bronchique (B) ou l'épithélium bronchique (D,F). x40 (A) ; x400 (B) ; x 100 (C,E) ; x1000 (D,F) (UMPC, 2009).

Les alvéoles forment des petits sacs dont la dimension varie en fonction de l'étape du cycle respiratoire. Chaque alvéole est bordée par un épithélium pavimenteux. Cet épithélium est constitué de pneumocytes de types I et II (Figure I.17.B). Les pneumocytes I sont des cellules aplaties incapables de se diviser, qui recouvrent 95 % de la surface alvéolaire mais ne représentent que 40 % des cellules épithéliales. Leurs prolongements cytoplasmiques très fins permettent des échanges rapides. Les pneumocytes II sont des cellules de forme cubique beaucoup plus volumineuses, qui représentent 60 % des cellules mais ne recouvrent que 3 à 5 % de la surface alvéolaire. Les pneumocytes II sont capables de se diviser. Ils sont caractérisés par la présence de corps lamellaires contenant le surfactant avant sa sécrétion (Figure I.18.A).

Les alvéoles sont séparées par les septa inter-alvéolaires, bordés de part et d'autre par un épithélium pavimenteux délimitant les alvéoles. Chaque septum contient un réseau de capillaires alvéolaires, bordés par des cellules endothéliales (Figure I.18.B). L'épaisseur de la séparation entre les cellules épithéliales et endothéliales est variable. En effet, elle peut être réduite à une simple membrane basale, permettant ainsi les échanges gazeux. Dans d'autres zones, les cellules épithéliales sont séparées des cellules endothéliales par un interstitium contenant des fibres de collagène.

La face luminale des alvéoles est recouverte par un film liquidien constitué de 3 couches :

- un glycocalyx, en contact avec l'épithélium, contenant des glycoprotéines et des Immunoglobulines de type A (IgA),
- une couche aqueuse, contenant des Immunoglobulines de type G (IgG) et des IgA,
- le surfactant, sécrété par les pneumocytes II et en contact avec l'air alvéolaire ; il permet de diminuer la tension superficielle à l'interface air - épithélium, empêchant le collapsus des alvéoles.

Les macrophages alvéolaires sont des cellules immunitaires présentes dans la lumière des alvéoles (Figure I.19.A). Ils ont pour fonction de phagocyter les éléments solides qui subsistent dans l'air, d'où leur nom de « cellules à poussières » (Figure I.19.B).

2.1.3. Fonction des voies respiratoires

2.1.3.1. Voies aériennes supérieures

Les voies aériennes supérieures interviennent essentiellement dans la respiration, en assurant des fonctions de conduction et de conditionnement de l'air. En plus de leur rôle dans la respiration, les voies aériennes supérieures sont impliquées dans la déglutition, la phonation et l'olfaction.

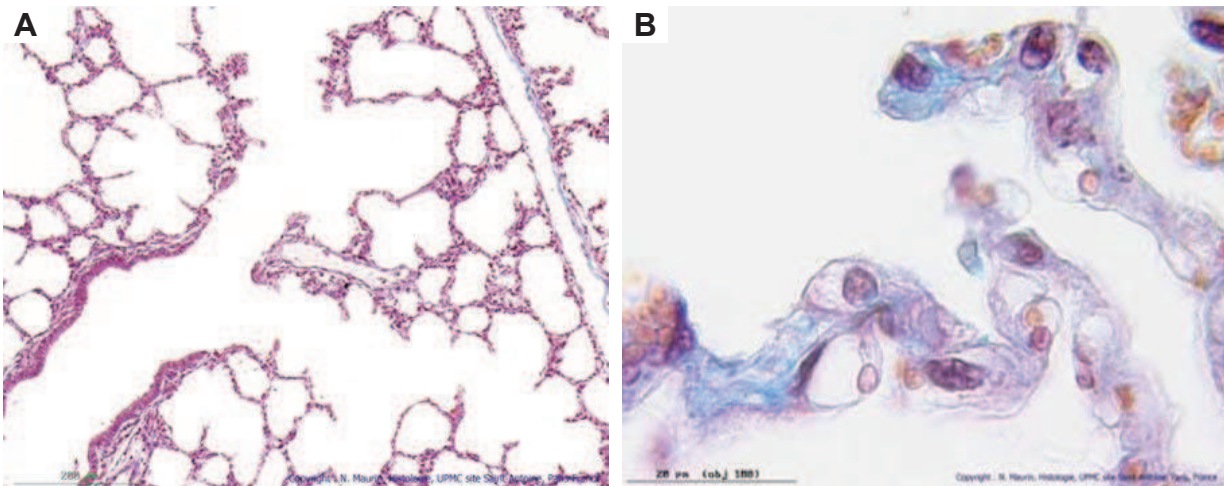


Figure I.17 : Coupes histologiques de parenchyme pulmonaire de porc, mettant en évidence une bronchiole respiratoire, des canaux alvéolaires et les sacs alvéolaires (A) ainsi qu'un septum alvéolaire (B). x100 (A) ; x1000 (B) (UMPC, 2009).

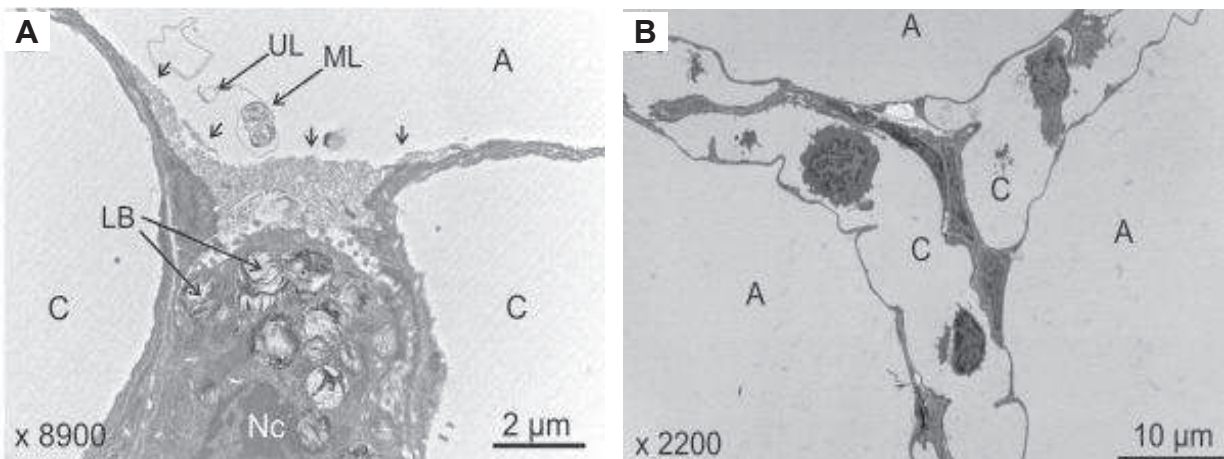


Figure I.18 : Images en microscopie électronique de septa inter-alvéolaires de porc. x8900 (A) ; x2200 (B) (Trachsel *et al.*, 2011).

C : capillaire ; A : alvéole ; Nc : noyau ; LB : corps lamellaire ; U- ou M-B : corps uni- ou multi-lamellaire.

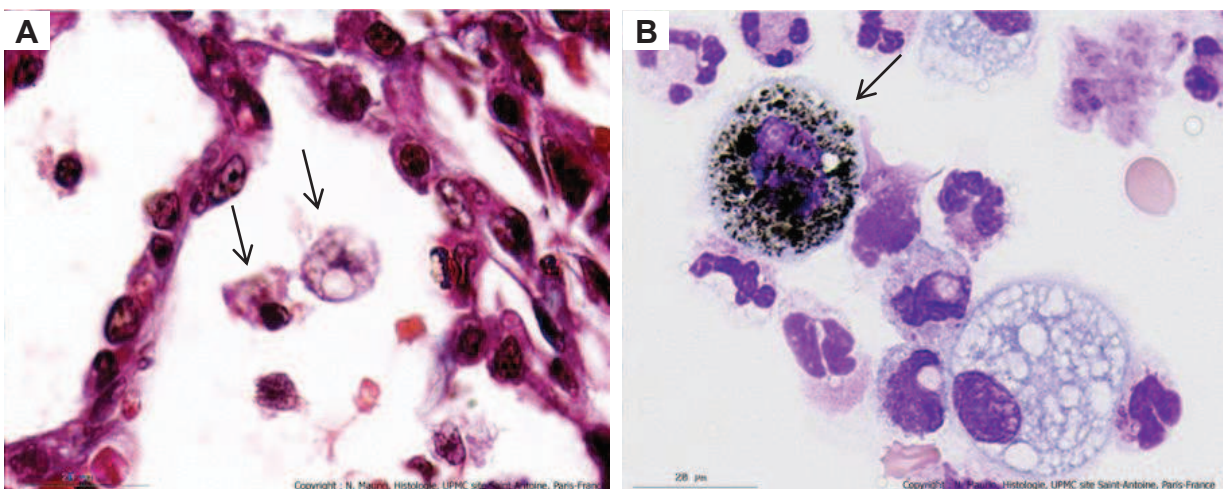


Figure I.19 : Coupe histologique d'alvéole pulmonaire de porc, mettant en évidence des macrophages alvéolaires (A) et image en microscopie d'un macrophage alvéolaire humain « empoussiéré » issu d'un lavage broncho-alvéolaire (B). x1000 (UMPC, 2009).

Les fosses nasales assurent des fonctions de conduction, en représentant le trajet normal de l'air. Elles permettent aussi le nettoyage de l'air inspiré grâce à la présence des vibrisses au niveau des narines et des cils et de mucus, au niveau de la muqueuse respiratoire. Cette muqueuse assure également l'humidification de l'air, par la présence de glandes à mucus, et son réchauffement grâce aux vaisseaux sanguins superficiels. En plus de ces fonctions respiratoires, les fosses nasales permettent le drainage des sinus et des voies lacrymales. Enfin, les fosses nasales sont impliquées dans l'olfaction grâce à la présence de cellules nerveuses olfactives.

Le pharynx constitue le carrefour aéro-digestif. En effet, il fait communiquer d'une part la cavité buccale avec l'œsophage, et d'autre part les fosses nasales avec le larynx. Il est donc impliqué dans la respiration en permettant la conduction de l'air inhalé.

Le larynx est principalement l'organe de la phonation. Il intervient également dans la respiration en laissant passer l'air inspiré et expiré par l'ouverture et la fermeture de la glotte. Enfin, il permet de diriger l'air vers la trachée et les aliments vers l'œsophage grâce aux mouvements de l'épiglotte.

2.1.3.2. Voies aériennes inférieures

Les voies aériennes inférieures sont constituées de trois zones ayant chacune une fonction spécifique. La trachée et l'arbre bronchique constituent une zone de conduction et de conditionnement de l'air, les bronchioles respiratoires ont une fonction de transition et les canaux alvéolaires et alvéoles constituent la zone respiratoire.

La trachée assure un rôle de conduction et l'humidification de l'air. Elle est également impliquée dans la clairance muco-ciliaire, grâce à la présence de nombreuses cellules ciliées au sein de son épithélium. L'activité de l'ascenseur muco-ciliaire permet la remontée du mucus jusqu'au pharynx, à une vitesse de 13 mm par minute.

L'arbre bronchique a des fonctions similaires à la trachée. Il assure la conduction de l'air et permet l'élimination des éléments solides contenus dans l'air grâce à l'ascenseur muco-ciliaire. Il convient cependant de noter que l'efficacité de cette clairance diminue à mesure que le diamètre des voies respiratoires se réduit.

Les bronchioles respiratoires et les alvéoles ont pour rôle essentiel l'hématose, c'est-à-dire les échanges gazeux par des différences de pression partielle. Ainsi, du dioxygène passe de l'air contenu dans les alvéoles vers le sang des capillaires alvéolaires, alors du CO₂ et de la vapeur d'eau sortent du sang pour rejoindre l'air.

2.2. Déposition respiratoire et rétention des particules

La déposition des particules le long de l'arbre respiratoire est un processus complexe, car il dépend des propriétés de l'aérosol, de la morphométrie pulmonaire et de la physiologie respiratoire (IRCP, 1994). Outre la complexité du processus, son étude est rendue difficile par l'absence de modèle représentatif. En effet, les études chez l'homme sont impossibles pour des raisons éthiques évidentes, alors que les modèles animaux ne peuvent reproduire la réalité de l'architecture pulmonaire humaine. Ainsi, de nombreux modèles mathématiques et informatiques ont été développés pour représenter la déposition des particules dans l'appareil respiratoire (Lazaridis *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). Dans ces modèles, trois régions pulmonaires sont définies : la région extra-thoracique, l'arbre trachéo-bronchique et la région alvéolaire (Valavanidis *et al.*, 2008). Ce découpage sera adopté au cours de ce chapitre.

2.2.1. Mécanismes de déposition des particules

La déposition des particules le long de l'arbre respiratoire est essentiellement liée à trois mécanismes : l'impaction, la sédimentation et la diffusion (Figure I.20). L'occurrence de l'un ou l'autre de ces mécanismes dépend de la taille des particules, de la géométrie de l'arbre respiratoire et de la vitesse du flux d'air (Luo and Liu, 2009; Zhang *et al.*, 2005).

L'impaction concerne principalement les grosses particules qui, de par leur inertie, ne suivent pas le flux d'air au niveau des courbures des voies respiratoires et entrent de fait en contact avec les parois de l'appareil respiratoire. Ainsi, l'impaction est proportionnelle à la taille des particules et à la vitesse du flux d'air, et a principalement lieu au niveau du pharynx et des zones de bifurcation (Sosnowski *et al.*, 2007) (Figure I.21).

La sédimentation a lieu lorsque l'attraction terrestre est supérieure à la force d'entraînement de l'air. Elle est proportionnelle à la taille des particules, mais inversement proportionnelle à la vitesse du flux d'air.

Enfin, la déposition par diffusion est due aux mouvements browniens, qui peuvent conduire la particule à entrer en contact avec les parois de l'arbre respiratoire suite à une collision avec les molécules d'air. Elle est inversement proportionnelle à la taille de la particule et à la vitesse du flux d'air, et a donc principalement lieu dans les alvéoles (Hussain *et al.*, 2011).

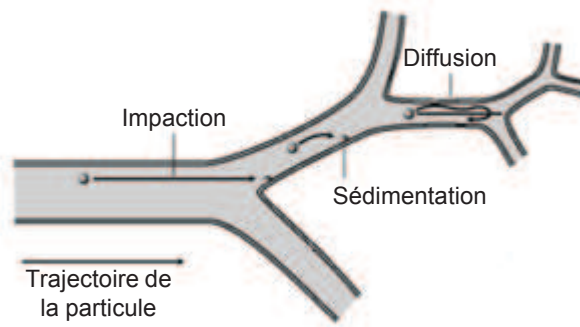


Figure I.20 : Mécanismes de déposition des particules (adapté de ILO, 2013).

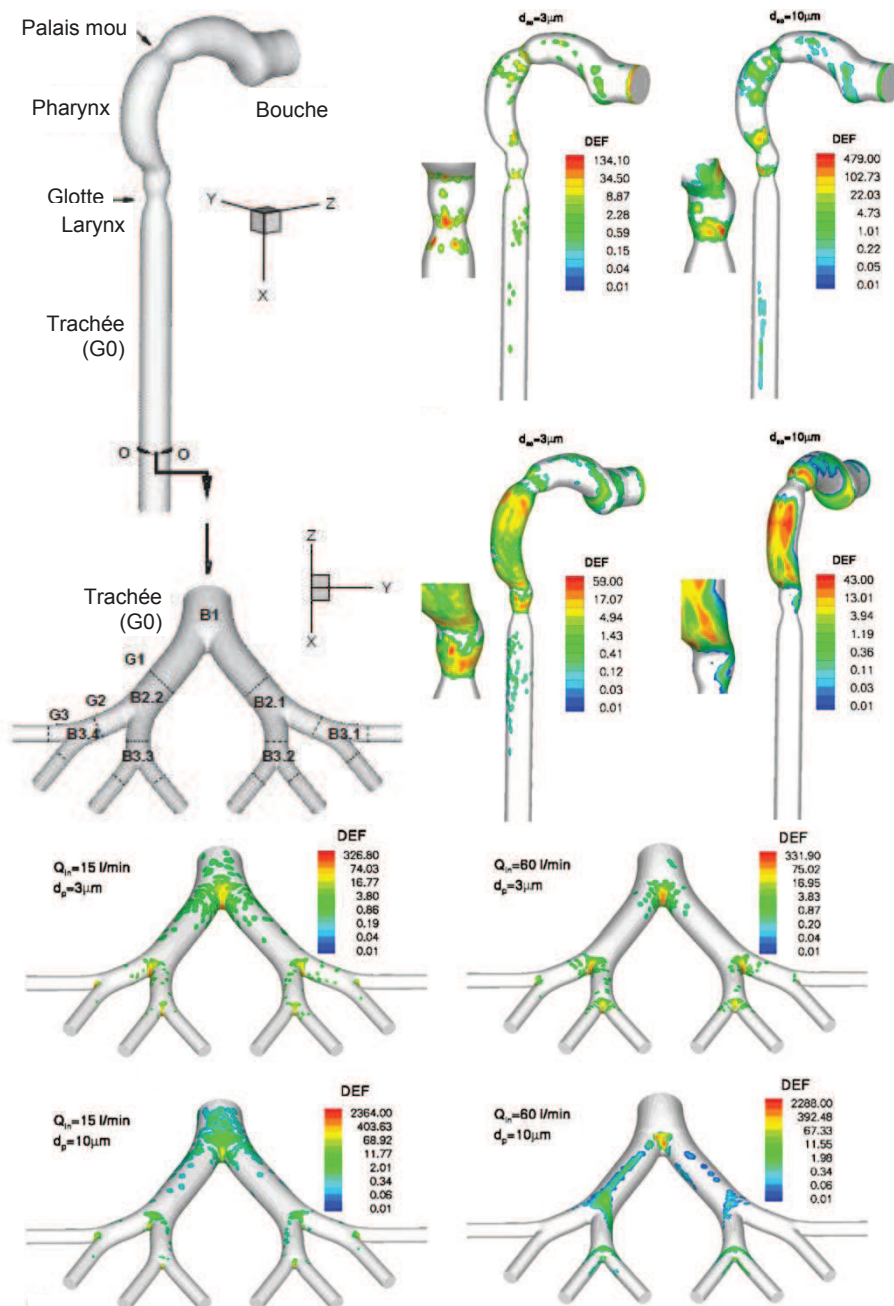


Figure I.21 : Influence de la morphologie pulmonaire, du diamètre des particules (d_p) et du débit inspiratoire (Q_{in}) sur la déposition des particules (DEF) (d'après Zhang *et al.*, 2005).

2.2.2. Zone de déposition des particules selon leur taille

La majorité des $PM_{>10}$ se dépose par impaction au niveau de l'oropharynx avant d'être déglutie. Les particules dont le D_{ae} est compris entre 2,5 et 10 μm ($PM_{2.5-10}$) se déposent principalement au niveau de l'arbre trachéo-bronchique. Environ 20 % des $PM_{0.1-2.5}$ sont capables de pénétrer jusqu'aux alvéoles, entraînant avec elles les composés adsorbés potentiellement toxiques. Enfin, les $PM_{0.1}$ se répartissent tout le long de l'arbre respiratoire et adoptent un comportement de plus en proche de celui des gaz à mesure que leur diamètre diminue, conduisant à une augmentation du taux de déposition au niveau extra-thoracique (Oberdorster *et al.*, 2005; Patton and Byron, 2007) (Figure I.22).

2.2.3. Paramètres individuels influençant la déposition des particules

Nous avons évoqué précédemment l'influence de la morphométrie pulmonaire et de la physiologie respiratoire sur la déposition des particules (IRCP, 1994). Ces deux paramètres sont cependant soumis à une grande variabilité interindividuelle (Kim and Hu, 2006). En effet, la morphométrie pulmonaire dépend essentiellement de l'âge et du sexe de l'individu, alors que la physiologie respiratoire est principalement associée au niveau d'activité physique. De plus, l'existence d'une pathologie respiratoire peut modifier fortement la physiologie respiratoire (Tobin *et al.*, 1983).

2.2.3.1. Influence de l'âge

Bennett *et al.* ont étudié le pourcentage de déposition de particules fines en fonction de l'âge de l'individu. Ils n'ont pas montré de différence significative de la fraction déposée entre les individus appartenant aux classes d'âge 20-40 ans, 41-60 ans et > 60 ans dans des conditions de repos, tous présentant une fraction déposée comprise entre 26 et 29 % (Bennett *et al.*, 1996). Bien qu'il de semble pas y avoir de différence en fonction de l'âge chez les adultes, la fraction déposée de particules fine (1 à 3 μm) est supérieure chez les enfants de moins de 9 ans, en comparaison avec les adultes (Isaacs and Martonen, 2005).

Une étude réalisée sur les particules ultrafines a montré que la fraction totale déposée était plus grande de 50 % chez les enfants que chez les adultes (Olvera *et al.*, 2012).

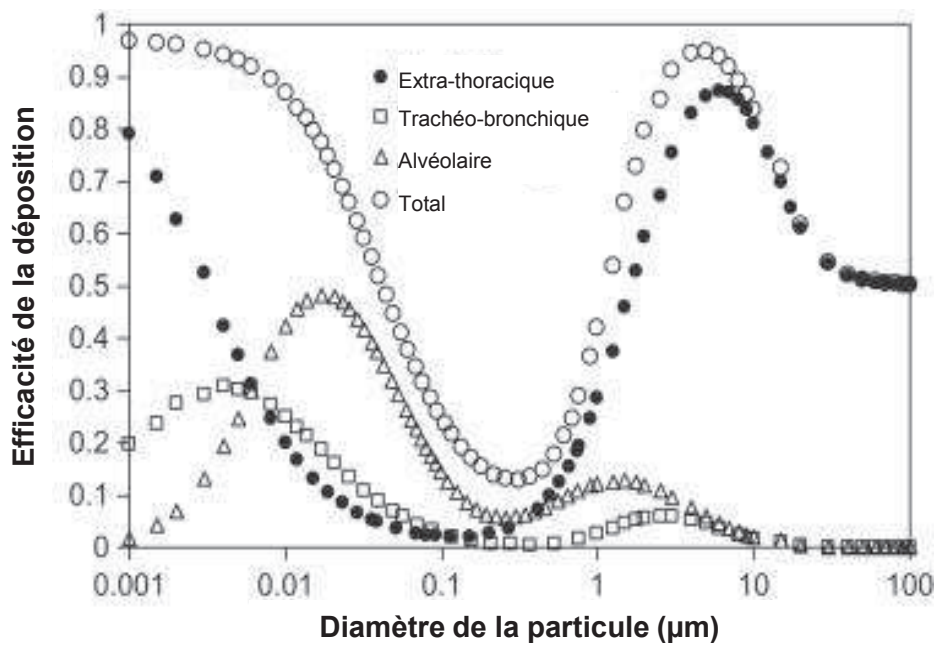


Figure I.22 : Répartition des particules atmosphériques le long de l'arbre respiratoire humain selon leur diamètre (d'après Elihn *et al.*, 2011).

2.2.3.2. Influence du sexe

L'étude menée par Bennett *et al.* sur la déposition de particules fines a mis en évidence une tendance à l'augmentation de la fraction déposée chez les femmes. Néanmoins, le taux de déposition (fraction déposée par unité de temps) était supérieur de 30 % chez les hommes, qui ont une fréquence respiratoire plus élevée (Bennett *et al.*, 1996). Kim et Hu ont quant à eux montré que la fraction totale déposée était similaire chez les femmes et les hommes pour des particules de 1 µm de diamètre, mais qu'elle était très nettement supérieure chez les femmes pour des particules ayant une taille comprise entre 3 et 5 µm (Kim and Hu, 1998).

Une étude menée sur la déposition des particules ultrafines a quant à elle montré que, quels que soient les paramètres respiratoires, la fraction déposée était supérieure chez les femmes pour des particules de 40 nm de diamètre, mais que cette différence disparaissait pour des particules plus grosses (40-100 nm) (Jaques and Kim, 2000).

2.2.3.3. Influence des paramètres respiratoires

Le paramètre respiratoire ayant la plus grande influence sur la déposition des particules semble dépendre du diamètre de ces dernières. En effet, une modélisation de la déposition des particules a mis en évidence que la période respiratoire est le facteur dominant pour les particules ayant un diamètre de 1 µm, alors que le volume courant apparaît comme le déterminant principal de la déposition des particules de 5 µm. La déposition des particules de taille intermédiaire (3 µm) semble être influencée de manière équivalente par ces deux paramètres. Pour chacune de ces trois tailles de particules, la fraction déposée augmente avec le volume courant et la période respiratoire, mais diminue avec le débit respiratoire (Kim and Hu, 2006).

Concernant les particules ultrafines, une étude a montré que, pour une taille de particules donnée, la fraction déposée augmentait proportionnellement au volume courant et de manière inversement proportionnelle au débit respiratoire (Jaques and Kim, 2000).

2.2.3.4. Influence de pathologies respiratoires

Une étude a montré que, lors de l'inhalation de particules fines, la fraction déposée était supérieure chez les patients atteints de Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) comparativement à des individus sains (40 % vs 26 %). De plus, les personnes atteintes de BPCO ayant un débit aérien supérieur, leur taux de déposition est 2,5 fois plus élevé que celui des sujets sains (Bennett *et al.*, 1997). Une autre étude a mis en évidence

une augmentation de la fraction déposée de particules fines de 16, 19, 59 et 103 % respectivement chez des patients fumeurs, fumeurs avec une maladie des petites voies respiratoires, asthmatiques et atteints de BPCO (Kim and Kang, 1997).

Comme pour les particules fines, le taux de déposition de particules ultrafines chez des sujets atteints de BPCO est 2,5 fois supérieur à celui observés chez les sujets sains (Löndahl *et al.*, 2012). La fraction déposée est elle aussi augmentée dans certaines conditions pathologiques. En effet, une étude a démontré que des enfants asthmatiques présentaient une fraction déposée de particules ultrafines (diamètre = 30 nm) plus importante de 21 % que des enfants sains (Olvera *et al.*, 2012).

2.2.4. Rétention et clairance pulmonaire des particules

Les mécanismes de clairance des particules représentent un aspect important des défenses pulmonaires, car l'élimination rapide des agents toxiques diminue leur temps d'action potentiel, tout en réduisant la probabilité d'une absorption locale. Différents mécanismes de clairance existent (Figure 1.23). Ils varient selon la région pulmonaire considérée, conduisant à l'élimination des particules des voies respiratoires avec une efficacité et une vitesse variables selon leur lieu de déposition. Il est néanmoins important de souligner le fait que l'élimination des voies respiratoires ne conduit que rarement à son élimination de l'organisme. En effet, les seuls mécanismes permettant une élimination réelle des particules sont la toux, l'éternuement et le mouchage. Les autres mécanismes de clairance conduisent à une redirection des particules vers le système digestif, le système lymphatique ou encore le réseau vasculaire pulmonaire.

2.2.4.1. Clairance nasale

Les particules présentes au niveau du nez peuvent être éliminées par différents mécanismes selon leur solubilité et leur localisation. Ainsi, les particules retenues par les vibrisses nasales sont éliminées par éternuement ou mouchage. L'élimination des particules ayant atteint la région postérieure du nez dépend de leur solubilité. En effet, les particules insolubles sont transportées avec le mucus nasal, grâce aux battements ciliaires de l'épithélium respiratoire, jusqu'au pharynx où elles sont dégluties. Chez un individu adulte sain, ce processus prend généralement 1 heure. Les particules solubles dans le mucus sont quant à elles susceptibles de se dissoudre et d'entrer dans les cellules épithéliales ou les vaisseaux sanguins sous-jacents (Klaassen and Casarett, 2001).

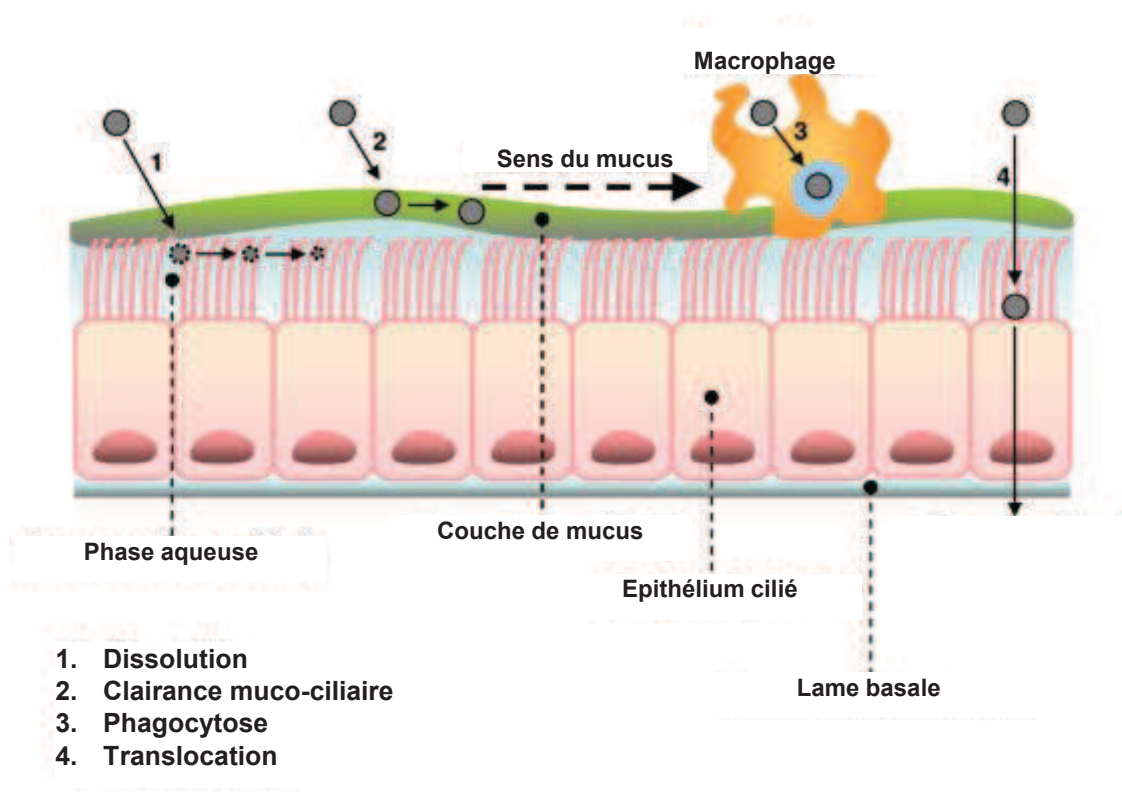


Figure I.23 : Mécanismes de clairance des particules (d'après Zhang *et al.*, 2011).

2.2.4.2. Clairance trachéo-bronchique

Les particules déposées au niveau de l'arbre trachéo-bronchique peuvent être éliminées par la clairance muco-ciliaire. Ce processus permet la remontée, en 24 à 48 heures, du mucus contenant les particules insolubles et les macrophages « empoussiérés » jusqu'au larynx où il est dégluti ou évacué sous forme de sputum (IRCP, 1994). Cependant, la clairance muco-ciliaire diminue progressivement à mesure que le diamètre des voies respiratoires se réduit. Comme dans le cas de la clairance nasale, les particules solubles dans le mucus sont susceptibles d'entrer dans les cellules épithéliales ou les vaisseaux sanguins (Klaassen and Casarett, 2001).

2.2.4.3. Clairance alvéolaire

Au niveau des alvéoles, la clairance des particules est essentiellement assurée par les macrophages qui phagocytent les particules insolubles présentes. La plupart des macrophages « empoussiérés » est éliminé via l'ascenseur muco-ciliaire après avoir été acheminée jusqu'aux bronchioles par le liquide alvéolaire, mais une partie des macrophages peut également être éliminée par le réseau lymphatique. Il est également possible que les particules ou certains de leurs composants solubles se dissolvent dans le surfactant et rejoignent la circulation sanguine ou lymphatique. Enfin, les particules les plus fines peuvent entrer directement dans l'épithélium (Klaassen and Casarett, 2001). Malgré ces mécanismes de clairance, certaines particules peuvent persister au niveau alvéolaire, le plus souvent dans des macrophages séquestrés dans l'interstitium (Figure I.24). Cette accumulation a été évaluée par Brauer *et al.* en 2001, qui ont mesuré des quantités moyennes de particules dans le parenchyme pulmonaire de $279 \cdot 10^6$ / g de tissu sec chez les habitants de Vancouver et de $2\,055 \cdot 10^6$ / g de tissu sec chez les habitants de Mexico. Ces concentrations sont à mettre en relation avec des concentrations atmosphériques moyennes en PM_{10} sur 3 ans de $14 \mu\text{g} / \text{m}^3$ à Vancouver et de $66 \mu\text{g} / \text{m}^3$ à Mexico, indiquant très clairement l'importance du niveau d'exposition sur la rétention des particules au niveau pulmonaire (Brauer *et al.*, 2001). Enfin, il a été démontré que 96 % des particules retenues au niveau du parenchyme pulmonaire sont des $PM_{2.5}$ (Churg and Brauer, 2000).

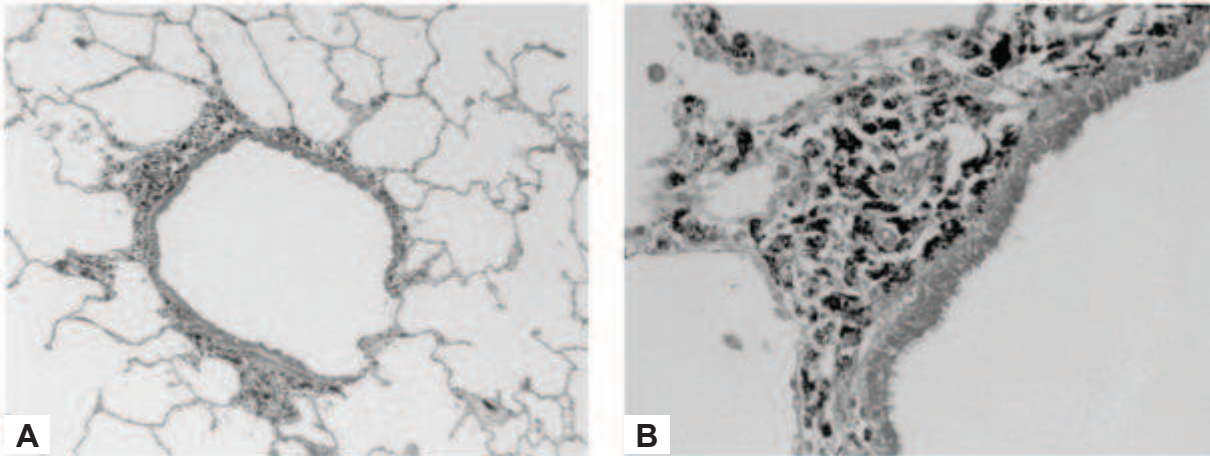


Figure I.24 : Coupes histologiques de bronchioles respiratoires montrant l'accumulation de particules au niveau du parenchyme pulmonaire. x50 (A) ; x200 (B) (Churg *et al.*, 2003).

2.3. Cancérogenèse broncho-pulmonaire

L'exposition chronique des individus à la pollution particulaire, associée à la rétention des particules au niveau du parenchyme pulmonaire, laisse supposer de potentiels effets à long terme, tels que l'apparition de cancers broncho-pulmonaires (CBP). Nous avons donc choisi de nous intéresser à ces pathologies, dont la classification, les propriétés et les étapes d'apparition seront détaillées dans le prochain chapitre.

2.3.1. Classification histologique des cancers broncho-pulmonaires

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'épithélium broncho-pulmonaire évolue très fortement au fur et à mesure des divisions bronchiques, incluant donc des types cellulaires différents selon les zones étudiées. Ainsi, bien que 99 % des CBP soient des carcinomes, la morphologie des tumeurs est extrêmement variable.

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.*, 2004). Ces deux types peuvent ensuite être subdivisés en différents sous-types (Figure I.25).

2.3.1.1. 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 I.26.A). 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 I.26.B). Ils peuvent être issus (i) des pneumocytes de type I ou de type II, ou (ii) 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).

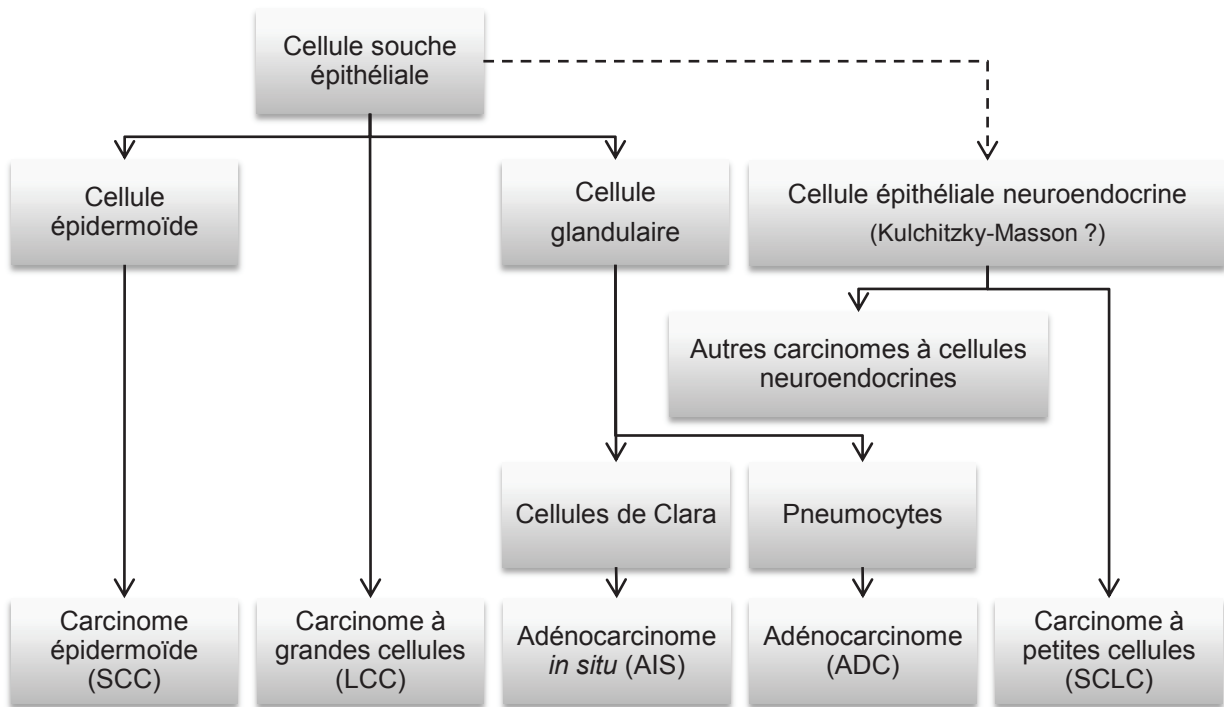


Figure I.25 : Classification des cancers broncho-pulmonaires (d'après Inserm, 2008, modifié selon Travis *et al.*, 2011).

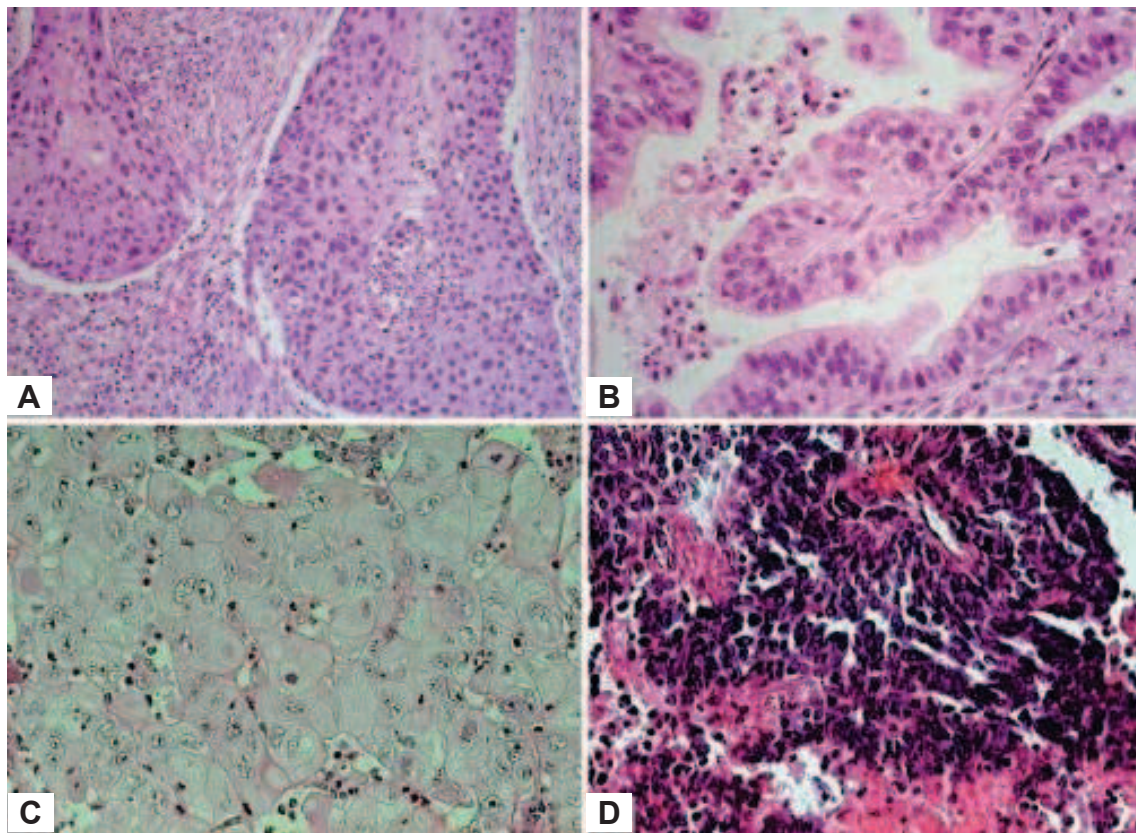


Figure I.26 : Coupes histologiques de tumeurs pulmonaires de type : carcinome à cellules squameuses (A), adénocarcinome (B), carcinome à grandes cellules (C) et carcinome à petites cellules (D) (Petersen, 2011).

Les carcinomes à grandes cellules possèdent une architecture indifférenciée (Figure I.26.C). Leur origine n'est pas clairement identifiée.

2.3.1.2. 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 I.26.D). 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.

2.3.2. Propriétés des cellules cancéreuses

La cancérogenèse est un processus multi-étapes, impliquant l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à l'acquisition, par des cellules à l'origine normales, d'un certain nombre de propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses. Ainsi, selon Hanahan et Weinberg, les cellules cancéreuses partagent six propriétés communes, dont la dynamique spatio-temporelle est encore discutée (Floor *et al.*, 2012) mais qui sont généralement admises :

- une indépendance des signaux de prolifération extérieurs,
- une insensibilité aux signaux antiprolifératifs,
- une résistance à l'apoptose,
- un potentiel répliatif illimité,
- des capacités d'angiogenèse,
- des capacités d'invasion et de diffusion métastatique (Hanahan and Weinberg, 2000).

En plus de ces six caractéristiques, les cellules cancéreuses présenteraient deux propriétés favorisant la cancérogenèse : l'instabilité génétique et l'activation de la tumorigenèse par l'inflammation, ainsi que deux propriétés « émergentes », toujours sujettes à controverse : la reprogrammation du métabolisme énergétique normal vers un métabolisme du glucose reposant principalement sur la glycolyse et l'échappement à la destruction par le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure I.27).

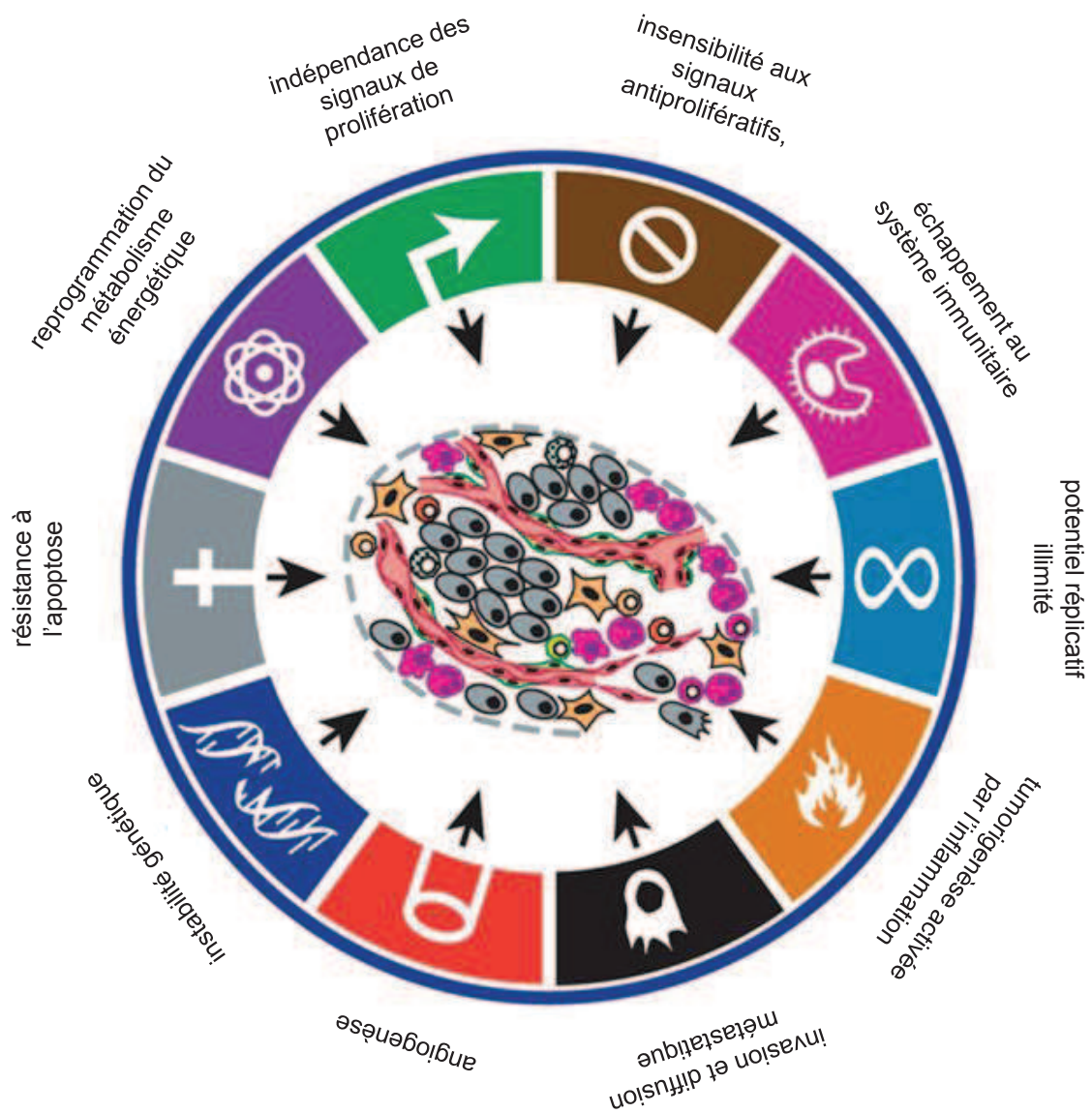


Figure I.27 : Propriétés des cellules cancéreuses (d'après Hanahan et Weinberg, 2011).

Les six propriétés initialement décrites ainsi que les mécanismes le plus souvent impliqués sont brièvement résumés ci-après (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

2.3.2.1. Indépendance des signaux de prolifération extérieurs

Les cellules cancéreuses n'ont, contrairement aux cellules normales, plus besoin des signaux prolifératifs extérieurs pour se multiplier. Cette indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs en provenance de l'environnement peut être obtenue par des modifications :

- des signaux extracellulaires (e.g. stimulation autocrine ou induction d'une stimulation paracrine),
- des récepteurs membranaires chargés de transmettre ces signaux (e.g. surexpression ou mutation de récepteurs, modification des types de récepteurs exprimés),
- de la transduction intracellulaire du signal (e.g. altération de la signalisation par les MAPKinases).

2.3.2.2. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

L'association de divers signaux antiprolifératifs permet, dans un tissu normal, la régulation de l'homéostasie tissulaire en inhibant la prolifération des cellules. Cette inhibition peut être due à deux mécanismes principaux :

- l'entrée des cellules en phase de quiescence (G_0), permettant un retour potentiel à un état prolifératif,
- le passage des cellules à un stade de différenciation terminale, généralement associé à une perte de leur potentiel mitotique.

Les cellules cancéreuses peuvent acquérir une résistance à l'entrée en G_0 suite à une dérégulation de la voie de la protéine RB impliquée dans le contrôle de la transition G_1 -S (Figure I.28). L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs liée à une absence de différenciation terminale semble quant à elle impliquer le facteur de transcription C-MYC, dont la surexpression conduit à un déséquilibre de la balance prolifération / différenciation.

2.3.2.3. Résistance à l'apoptose

La machinerie apoptotique regroupe un ensemble de protéines, agissant comme régulateurs ou effecteurs. Les régulateurs ont pour rôle de détecter des perturbations provenant de l'environnement cellulaire ou de l'intérieur de la cellule. Les signaux

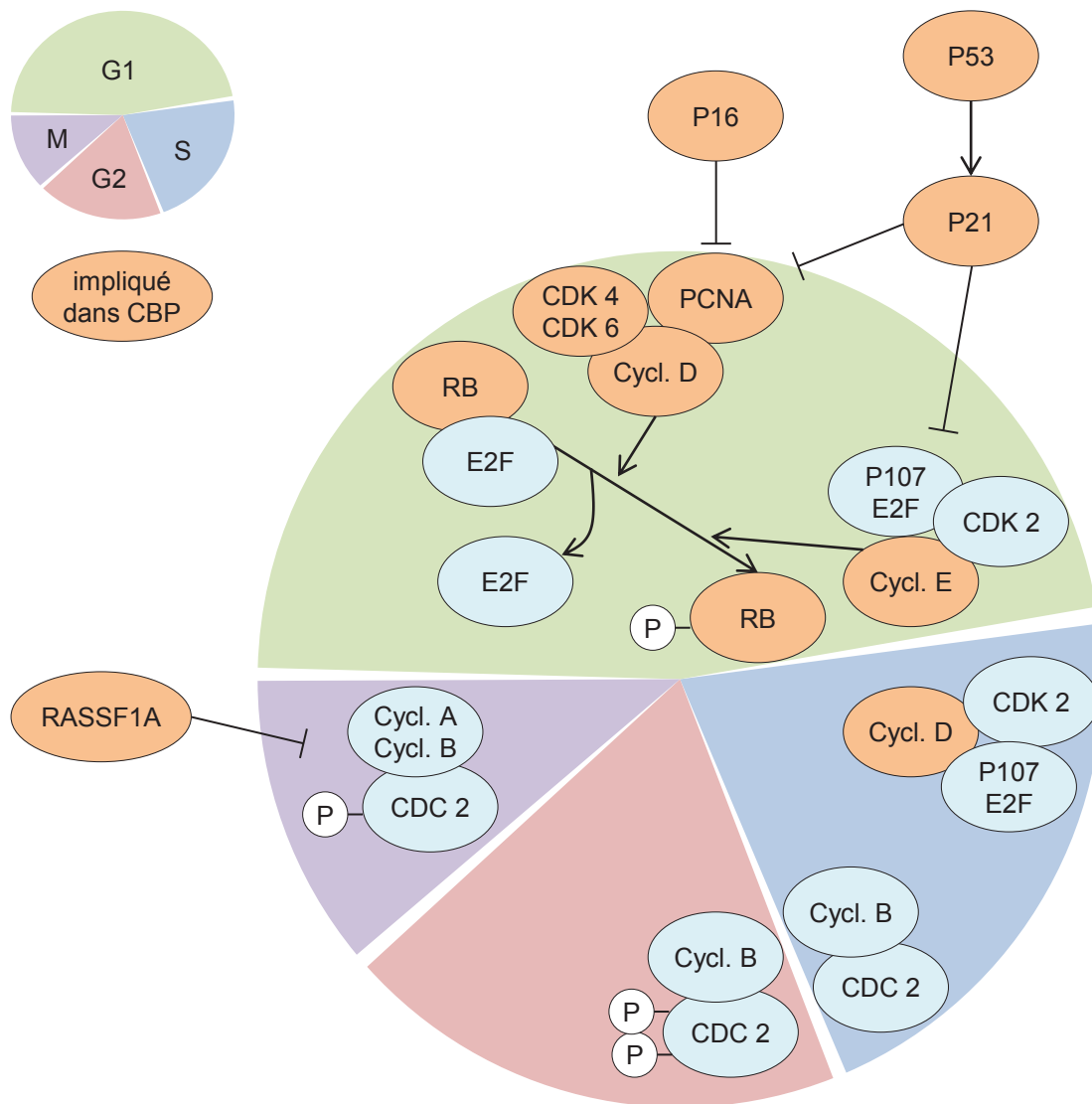


Figure I.28 : Régulation du cycle cellulaire (adapté de Baldi *et al.*, 2011).
 CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire ; Cycl. : Cycline.

extracellulaires de mort provoquent l'apoptose de cellules saines par la voie « extrinsèque », conduisant à l'activation d'une protéase spécifique appelée caspase 8. A l'inverse, les signaux intracellulaires déclenchent la voie « intrinsèque » de l'apoptose (Figure I.29). Cette voie mitochondriale conduit à l'activation de la caspase 9. Que l'activation des caspases soit liée à une signalisation extrinsèque, intrinsèque ou à une « communication-croisée » entre les deux voies, les caspases 8 et 9 initiatrices, conduisent à l'activation d'autres protéases, dont la caspase 3 effectrice, aboutissant *in fine* à la dégradation sélective du contenu intracellulaire.

La résistance à l'apoptose est une capacité fondamentale des cellules cancéreuses. Elle est généralement obtenue par une dérégulation des voies de signalisation des dommages intracellulaires. Le senseur intracellulaire le plus fréquemment décrit comme étant dysfonctionnel dans les cellules tumorales est la protéine P53. Souvent qualifiée de « gardien du génome », cette protéine a pour rôle essentiel la détection et la signalisation des dommages à l'ADN et intervient en partie dans l'apoptose induite par l'hypoxie ou l'hyperactivation d'oncogènes.

2.3.2.4. Potentiel répliatif illimité

Les cellules normales de l'organisme sont programmées pour effectuer un nombre limité de divisions. Cette restriction est assurée par deux mécanismes que sont la sénescence, correspondant à une entrée dans un état non-prolifératif mais viable, et la crise, conduisant à la mort cellulaire. Il semblerait que, dans des cellules en culture, une crise apparaisse dans des cellules ayant réussi à outrepasser la première barrière qu'est la sénescence et que, en de rares cas, quelques cellules survivent à cette crise et acquièrent un potentiel répliatif illimité. Certains auteurs supposent qu'un phénomène similaire pourrait avoir lieu au cours de la cancérogenèse.

La capacité des cellules à proliférer de manière indéfinie dépend des télomères. Les télomères sont constitués de répétitions d'hexanucléotides, dont la longueur permet d'assurer la protection des extrémités chromosomiques. La longueur des télomères diminuant progressivement au cours de divisions cellulaires, leur capacité de protection est perdue après un certain nombre de mitoses, conduisant à une instabilité chromosomique qui initie l'entrée en crise. Cependant, il existe une ADN-polymérase spécifique appelée télomérase, capable de maintenir la longueur des télomères. La télomérase n'est que très peu exprimée dans des cellules normales, mais voit son expression augmentée à des niveaux significatifs lui permettant d'être fonctionnelle dans la grande majorité des cellules cancéreuses.

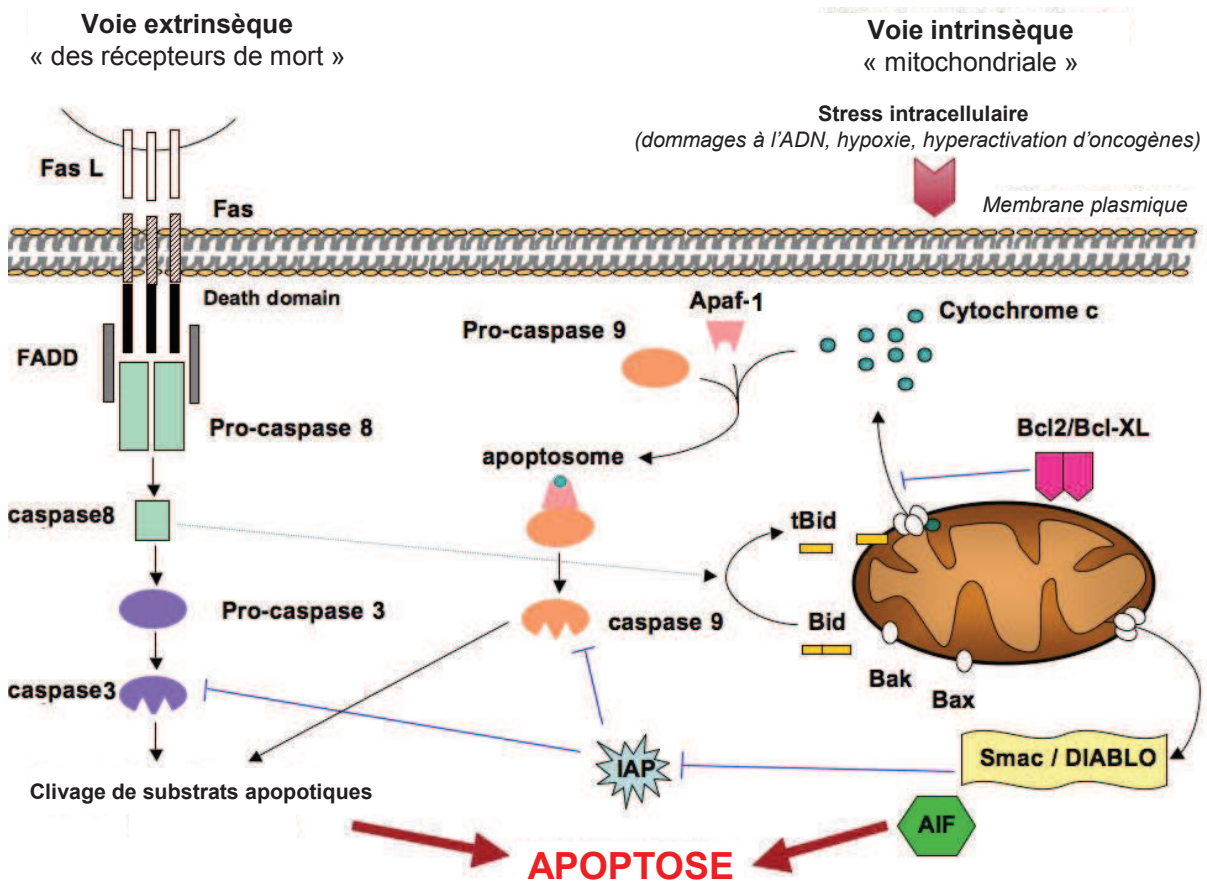


Figure I.29 : Voies de signalisation de l'apoptose (d'après Bellance *et al.*, 2009).

2.3.2.5. Capacité d'angiogenèse

Pour permettre leur développement, les cellules tumorales ont, comme les autres cellules de l'organisme, besoin d'être alimentées par des vaisseaux sanguins. Cependant, la mise en place d'une néo-vascularisation tumorale nécessite un « switch » angiogénique, la vascularisation étant physiologiquement dans un état quiescent à l'âge adulte. Ainsi, un déséquilibre des facteurs régulant l'angiogenèse s'installe et se maintient en faveur de molécules pro-angiogéniques, telles que le VEGF ou des membres de la famille du FGF.

Une fois ce « switch » angiogénique activé, le profil de néo-vascularisation de la tumeur est extrêmement variable, allant d'une quasi-absence de vaisseaux à une vascularisation très dense, et dépend à la fois des cellules cancéreuses et du microenvironnement tumoral.

2.3.2.6. Capacité d'invasion et de diffusion métastatique

La capacité d'une cellule tumorale à envahir les tissus adjacents dépend à la fois de sa forme, des jonctions avec les cellules avoisinantes et de ses interactions avec la matrice extra-cellulaire. Il semble que les capacités d'invasion et de métastase soient largement associées à la réalisation d'un programme génétique associé à la morphogénèse au stade embryonnaire et détourné dans les carcinomes. Ce phénomène, appelé transition épithélio-mésenchymateuse, conduit entre autres modifications à :

- une perte des jonctions adhérentes, associée au passage d'une morphologie épithéliale polygonale à une apparence fibroblastique fusiforme,
- l'expression d'enzymes de dégradation de la matrice extra-cellulaire,
- une mobilité accrue,
- une résistance à l'apoptose augmentée.

2.3.3. Evolution et altérations associées

La cancérogenèse est un processus multi-étape, au cours desquelles les propriétés fonctionnelles précédemment décrites sont acquises progressivement et auxquelles sont associées différentes altérations morphologiques identifiables d'un point de vue histologique.

2.3.3.1. 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 prénéoplasiques 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 I.30) :

- la dysplasie légère est marquée par des anomalies discrètes (hypercellularité et pléomorphisme), touchant le tiers inférieur de l'épithélium ;
- la dysplasie est dite modérée lorsque la zone basale s'étend sur les deux tiers inférieurs de l'épithélium, que les anomalies s'intensifient (hypercellularité, pléomorphisme moyen et anisocytose) et que des mitoses sont observables dans le tiers inférieur ;
- la dysplasie sévère, concerne les tissus où la zone basale recouvre tout l'épithélium et présente de nombreuses anomalies (perte de maturation, anisocytose et pléomorphisme important), auxquelles sont associées la présence de mitoses sur les deux tiers inférieurs et de noyaux verticaux dans le tiers inférieur ;
- 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, et où des mitoses sont visibles sur toute la hauteur de l'épithélium.

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

2.3.3.2. Anomalies associées à la cancérogenèse

L'acquisition des propriétés cancéreuses par les cellules est liée à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur résultant d'une accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques (Fong *et al.*, 2003).

Les oncogènes, favorisant le processus de cancérogenèse, peuvent être ainsi activés par différents mécanismes génétiques (Alberts *et al.*, 2002) et épigénétiques que sont :

- une mutation dans la séquence codante du gène conduisant à la production d'une protéine hyperactive en quantité normale ;
- une amplification génique, menant à la surproduction d'une protéine normale ;

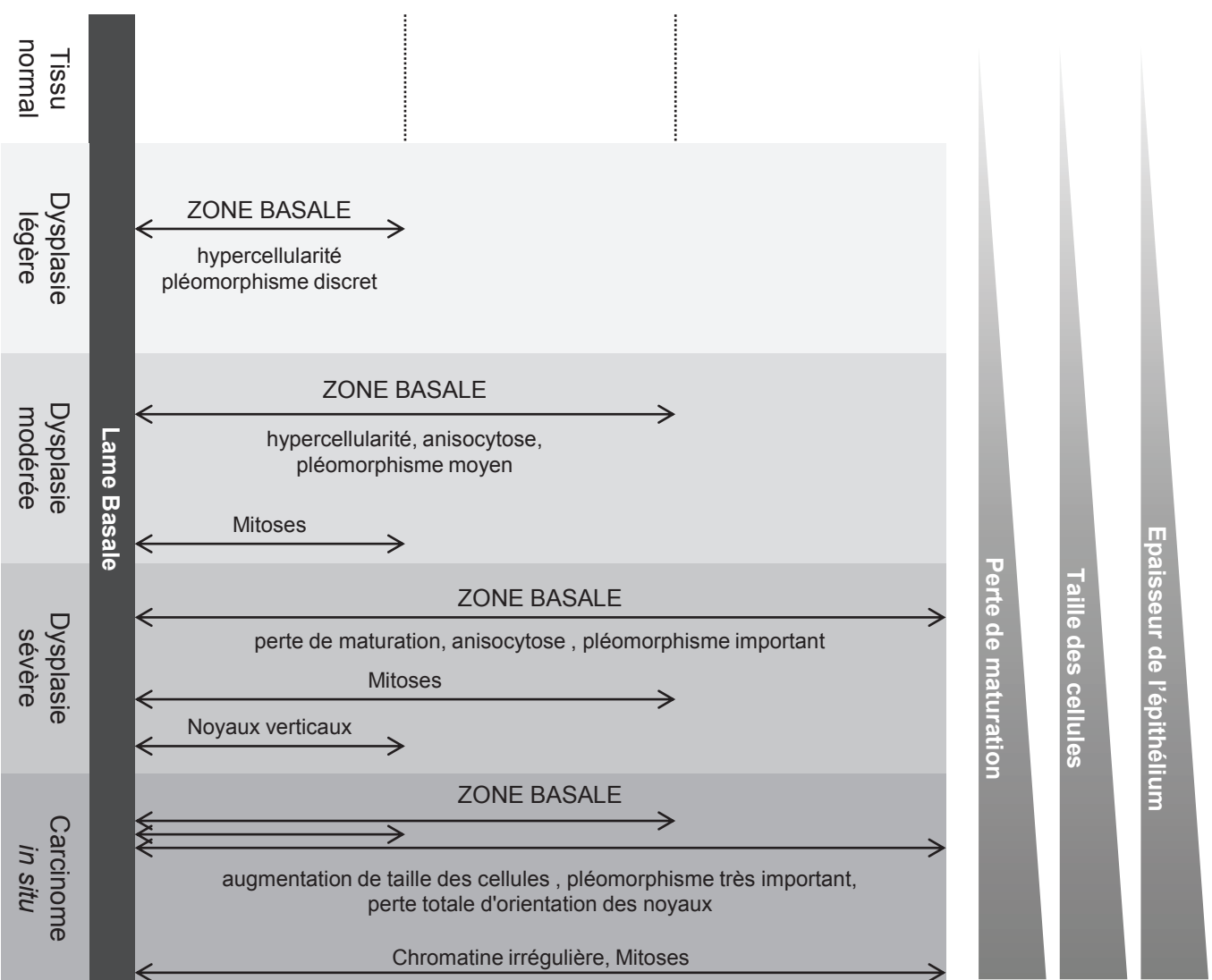


Figure 1.30 : Evolution histologique de tissu normal vers le carcinome *in situ* (d'après Kerr, 2001 ; Brambilla, 2002).

- un réarrangement chromosomique, conduisant à la surproduction d'une protéine normale sous l'influence d'un promoteur fort ou à la production d'une protéine de fusion hyperactive ou surexprimée ;
- une hypométhylation de promoteur, conduisant à la levée de l'inhibition de la transcription de l'oncogène (Gaykalova *et al.*, 2012; Hur *et al.*, 2013) ;
- des modifications d'histone permettant une activation de la transcription dans une zone normalement inactive (Jensen *et al.*, 2009).

La perte totale de la fonction suppresseur de tumeur d'un gène nécessite, selon le modèle « two-hit » de Knudson, l'inactivation des deux allèles (Knudson, 2001). La perte d'un seul des deux allèles peut également, pour certains gènes suppresseurs de tumeur « haplo-insuffisants », conduire à un risque accru de développer une tumeur (Balmain *et al.*, 2003) (Figure I.31). La perte de ces allèles peut elle aussi être due à différents mécanismes génétiques et épigénétiques que sont :

- une mutation conduisant à la production d'une protéine non-fonctionnelle ou dont l'activité est réduite ;
- une délétion du gène ;
- une non-disjonction, aboutissant à la perte d'un allèle dans l'une des cellules filles et à la présence de trois copies du gène dans l'autre cellule fille ;
- un phénomène de recombinaison mitotique qui peut conduire l'une des cellules filles, si l'un des allèles est non-fonctionnel (muté ou perdu) avant la mitose, à avoir les deux copies non-fonctionnelles du gène ;
- une hyperméthylation du promoteur conduisant à l'extinction (*silencing*) épigénétique du gène (Herman, 2004) ;
- des modifications d'histones conduisant à une perte d'expression (Feng *et al.*, 2009).

Il est important de souligner que les mécanismes de non-disjonction, recombinaison mitotique et délétion peuvent conduire à un état particulier appelé perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity). Ce phénomène est fréquemment décrit dans les cancers du poumon, et est associé à la perte de différents gènes suppresseurs de tumeur en fonction du locus touché (Tableau I.6).

En plus des différents mécanismes décrits ci-dessus, l'expression des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur peut également être modifiée par les micro-ARN (miRNA), un autre mécanisme épigénétique agissant au niveau post-transcriptionnel. Ainsi, une augmentation de l'expression de l'oncogène *KRAS* (Christensen *et al.*, 2009) ou encore une diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Liu *et al.*, 2013) ont pu être décrites sous l'action de différents miRNA.

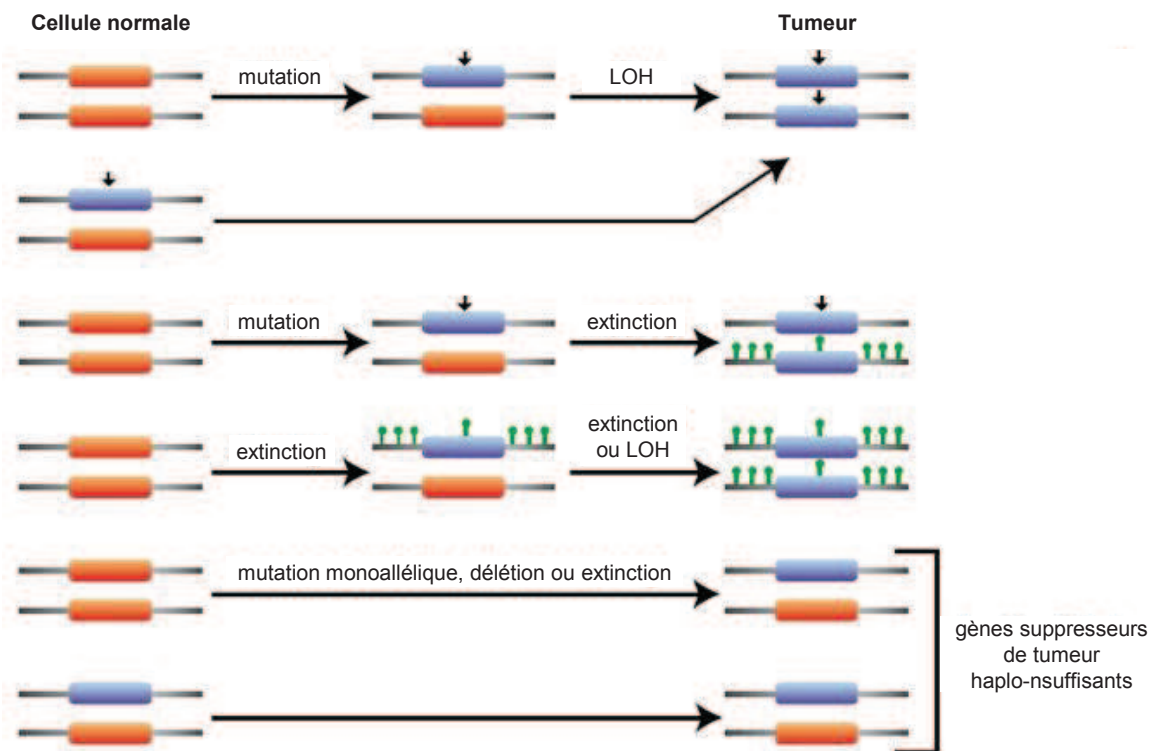


Figure I.31 : Mécanismes d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (d'après Balmain *et al.*, 2003).

Les mutations ponctuelles sont indiquées par les flèches verticales, les cytosines méthylées par les ronds verts, les allèles actifs par les rectangles rouges et les allèles inactifs par les rectangles bleus. LOH : Loss of Heterozygosity.

Chromosome et Bras	Région	Gène cible	SCC	ADC	SCLC
2q	?	?		x	
3p	3p14.2	<i>FHIT</i>	x	x	x
3p	3p21.31	<i>RASSF1</i>	x	x	x
5q	5q21	<i>APC</i>	x		x
9p	9p21	<i>P16^{INK4A}</i>	x	x	
13q	13q14	<i>RB</i>	x	x	x
17p	17p13.1	<i>TP53</i>	x	x	x
18q	18q21	<i>SMAD2</i>		x	
18q	18q21	<i>SMAD4</i>		x	
22q	22q12.1	<i>MYO18B ?</i>		x	x

Tableau I.6 : Loci fréquemment touchés par des pertes d'hétérozygotie dans les différents types de cancers broncho-pulmonaires (d'après Lantuéjoul *et al.*, 2009 ; Kohno et Yokota, 1999 ; Yokota et Kohno, 2004).

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

Même si la nature et l'ordre exact d'apparition de ces altérations peuvent varier d'une tumeur à l'autre, il semble qu'un profil commun puisse se dégager pour la cancérogenèse bronchique (SCC) (Brzeziańska *et al.*, 2012; Lantuéjoul *et al.*, 2009). Chacune des étapes histologiques précédemment décrites peut ainsi être associée à différentes altérations moléculaires (Figure I.32).

Différentes anomalies ont également été identifiées dans les autres types de tumeurs, mais de manière moins détaillée. Ainsi, l'évolution de cellules épithéliales bronchiolaires ou alvéolaires vers le stade hyperplasique peut être associée à une mutation de *KRAS* (15 % des cas), de la *β-caténine* (< 10 %), une LOH au niveau 3p (80 %), ainsi qu'une inactivation de P16^{INK4A} (70 %) ou de RB (15 %). Cette hyperplasie peut évoluer en adénocarcinome suite à une inactivation de P53 (50 % des cas) et une LOH en 13q (60 %). Enfin, cet adénocarcinome peut devenir métastatique après des LOH en 2q (70 % des cas), 9p (80 %), 18q (85 %) et 22q (75 %), ainsi qu'après une amplification de *C-MYC* (10 %) (Yokota and Kohno, 2004).

Les tumeurs neuro-endocrines suivent également une évolution dont la première étape est une LOH en 3p (80 % des cas) et une inactivation de RB (90 %), suivie par une seconde étape impliquant une inactivation de *P53* (90 % des cas), une LOH en 5q ou en 22q (70 % chacune), pour aboutir à un SCLC primaire. Celui-ci peut évoluer en carcinome métastatique suite à une amplification d'un membre de la famille *MYC* dans 30 % des cas (Yokota and Kohno, 2004).

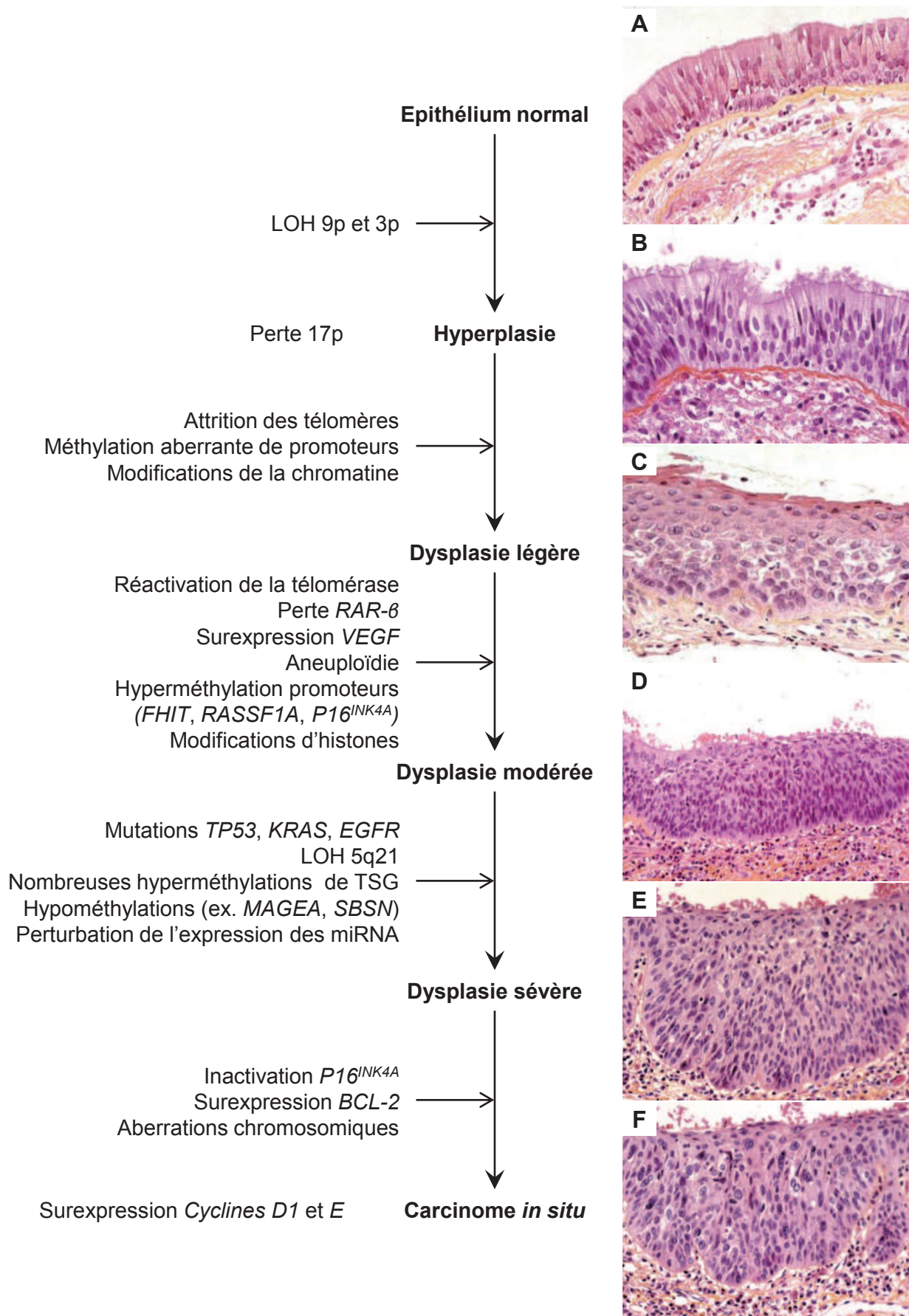


Figure I.32 : Anomalies génétiques et épigénétiques impliquées dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire (adapté de Lantuéjoul *et al.*, 2009 ; Brzezińska *et al.*, 2013 ; A,C,E,F : Gazdar et Brambilla, 2010 ; B,D : Lantuéjoul *et al.*, 2009).

LOH : Loss of Heterozygosity ; TSG : Gène Suppresseur de Tumeur

Depuis plusieurs décennies, un grand nombre d'études épidémiologiques de tous types ont été menées afin d'explorer un éventuel lien entre l'exposition chronique à la pollution atmosphérique particulaire ($PM_{2.5}$ et PM_{10}) et l'apparition de cancers broncho-pulmonaires. Malgré des résultats inconstants et une significativité parfois faible, les éléments étayant l'hypothèse d'une augmentation de risque de mortalité par cancer broncho-pulmonaire associée à l'exposition aux $PM_{2.5}$ sont de plus en plus nombreux, renforçant la plausibilité d'un lien de causalité (Figure I.33). Selon une étude très récente, l'augmentation de la concentration atmosphérique en $PM_{2.5}$ de $5 \mu\text{g} / \text{m}^3$ entraînerait une augmentation des cancers pulmonaires de 18 % et en particulier des adénocarcinomes (55 %) (Raaschou-Nielsen et al., 2013). Cependant, les mécanismes d'actions potentiellement impliqués ne sont pas intégralement décrits et leur connaissance nécessite donc d'être approfondie.

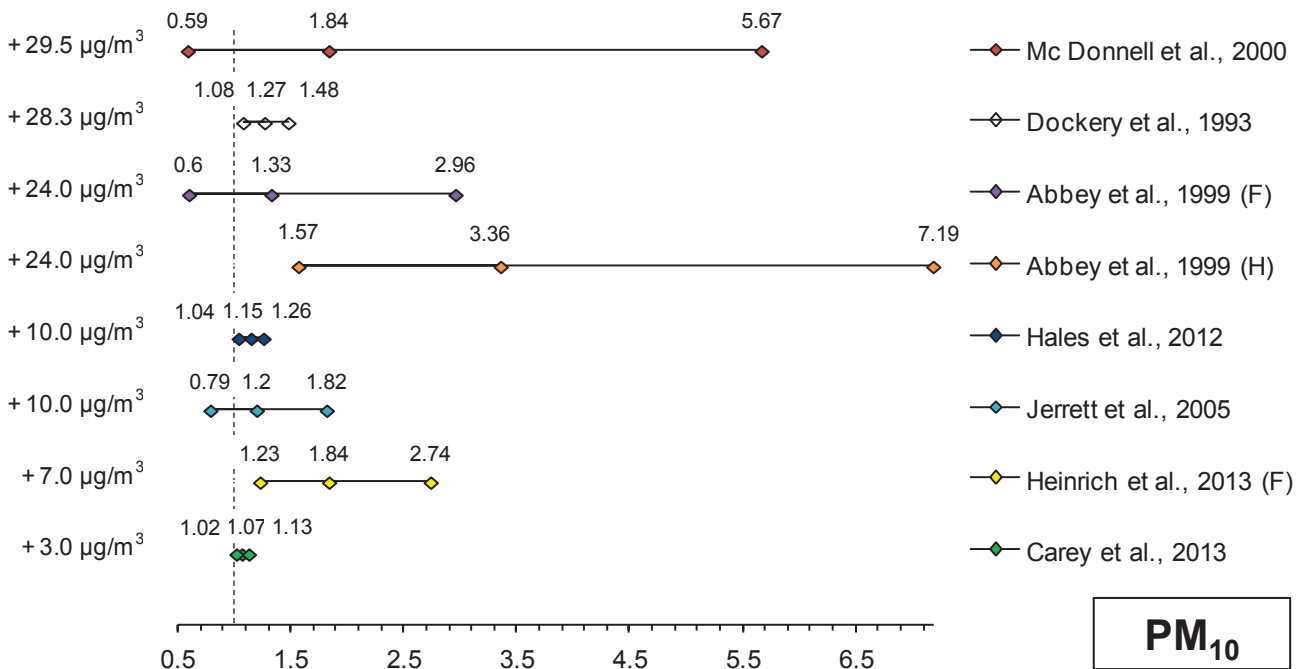
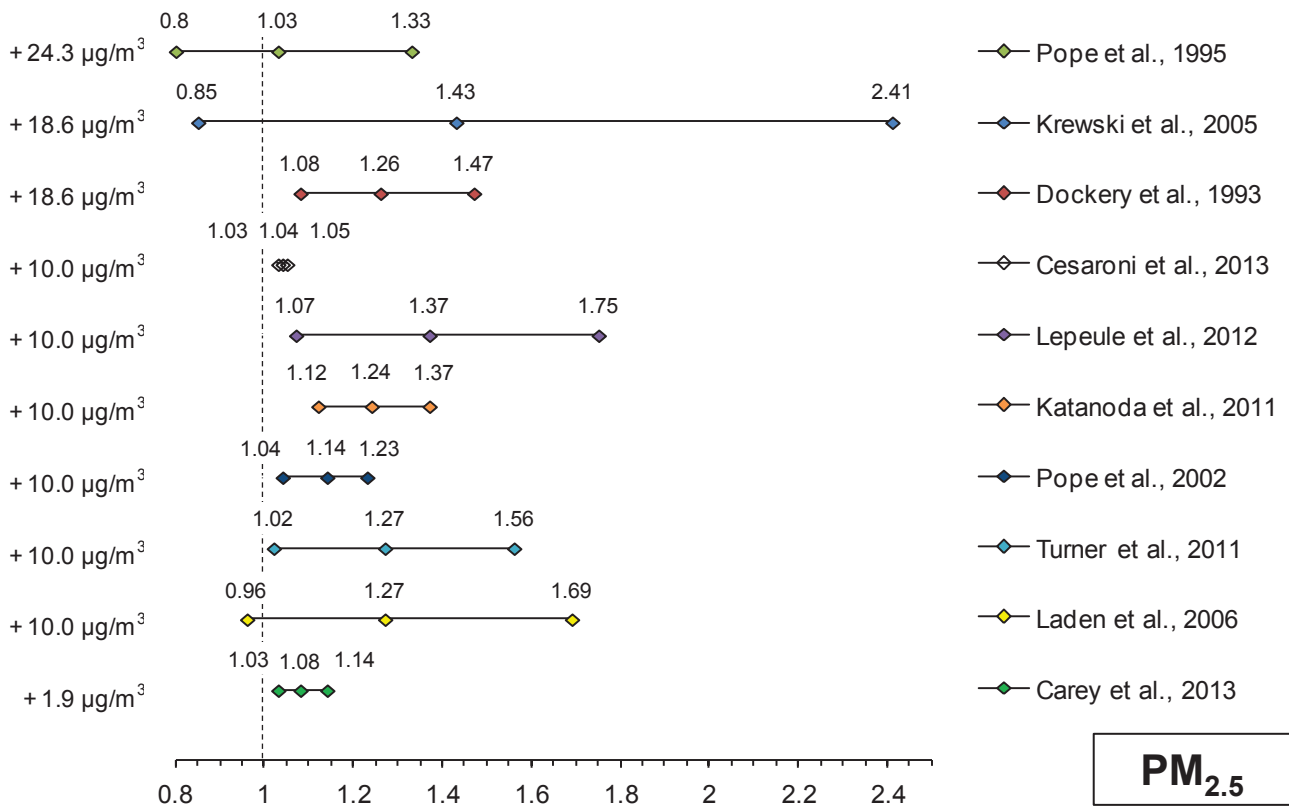


Figure I.33 : Synthèse des risques relatifs de mortalité par cancer broncho-pulmonaire décrits dans la littérature, en fonction de l'augmentation de la concentration en PM_{2.5} et PM₁₀.
 (F) : femmes uniquement ; (H) : hommes uniquement ; PM : Particulate Matter.

3. MECANISMES CELLULAIRES DE TOXICITE DES PM_{2.5}

➤ 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 cancérigène. Nous nous pencherons donc sur les processus de stress oxydant, d'activation métabolique, de génotoxicité et d'altération épigénétique.

3.1. Stress oxydant.....	48
3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	48
3.1.2. Conséquences biochimiques du stress oxydant.....	48
3.1.3. Stress oxydant et PM _{2.5}	49
3.1.3.1. Surface de la particule	49
3.1.3.2. Métaux	49
3.1.3.3. Fraction organique	50
3.2. Activation métabolique	51
3.2.1. Métabolisation des xénobiotiques	51
3.2.1.1. Fonctionnalisation	51
3.2.1.2. Conjugaison	52
3.2.1.3. Elimination.....	52
3.2.2. Activation métabolique de composés spécifiques	52
3.2.2.1. HAP	53
3.2.2.2. COV	53
3.2.2.3. PCB.....	53
3.2.3. Modulation de l'expression des EMX par les xénobiotiques.....	54
3.3. Lésions et réparation de l'ADN.....	55
3.3.1. Génotoxicité directe associée aux PM _{2.5}	55
3.3.1.1. Génotoxicité liée aux espèces oxydantes.....	55
3.3.1.2. Génotoxicité directe des HAP	56
3.3.2. Mécanismes de réparation de l'ADN.....	57
3.3.2.1. Réparation par excision de base	58
3.3.2.2. Réparation par excision de nucléotide.....	58
3.3.2.3. Réparation des cassures double-brin	59
3.3.3. Génotoxicité indirecte.....	59
3.3.3.1. Réparation de l'ADN	59
3.3.3.2. Télomérases	60
3.3.3.3. Fuseau mitotique.....	61
3.4. Modifications épigénétiques	63
3.4.1. Méthylation de l'ADN	63
3.4.1.1. Méthylation des îlots CpG.....	63
3.4.1.2. Méthylation globale de l'ADN.....	64
3.4.1.3. Effets des PM _{2.5}	64
3.4.2. Modifications post-traductionnelles d'histones.....	66
3.4.2.1. Types de modifications	66
3.4.2.2. Code histone	67
3.4.2.3. Effets des PM _{2.5}	68
3.4.3. miRNA.....	69
3.4.3.1. Formation.....	69
3.4.3.2. Mode d'action.....	70
3.4.3.3. Effets des PM _{2.5}	71
3.4.4. Interactions entre les mécanismes épigénétiques	72

3.1. Stress oxydant

3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés oxygénés réactifs, possédant un électron non-apparié sur leur couche de valence. Certains sont des radicaux libres, tels que l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $\cdot OH$, 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 I.34).

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 I.35). 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).

3.1.2. 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 I.36).

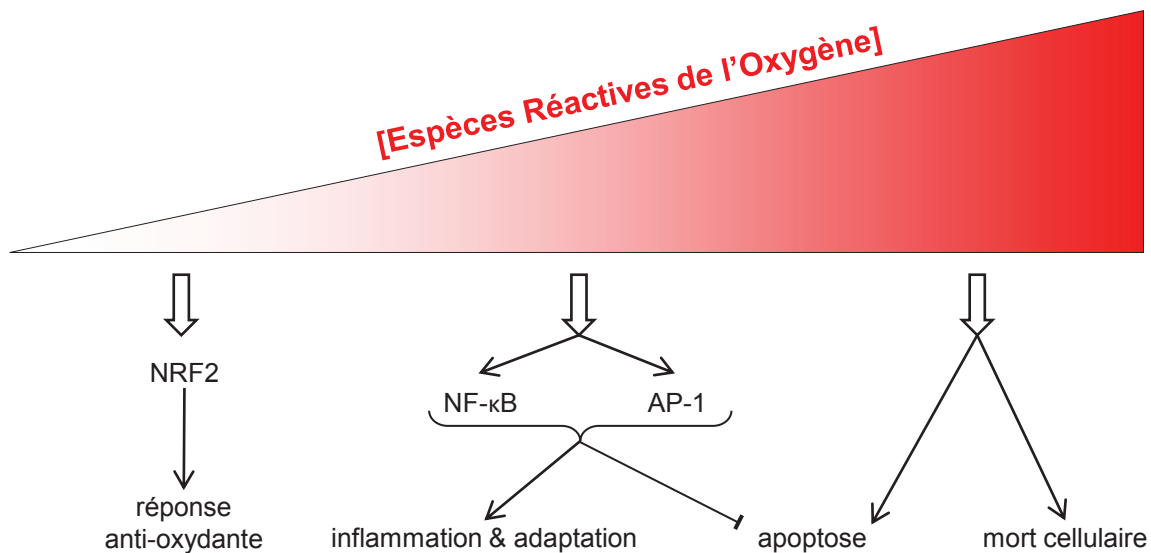


Figure I.34 : Réponse cellulaire aux espèces réactives de l'oxygène (adapté de Novo et Parola, 2008).

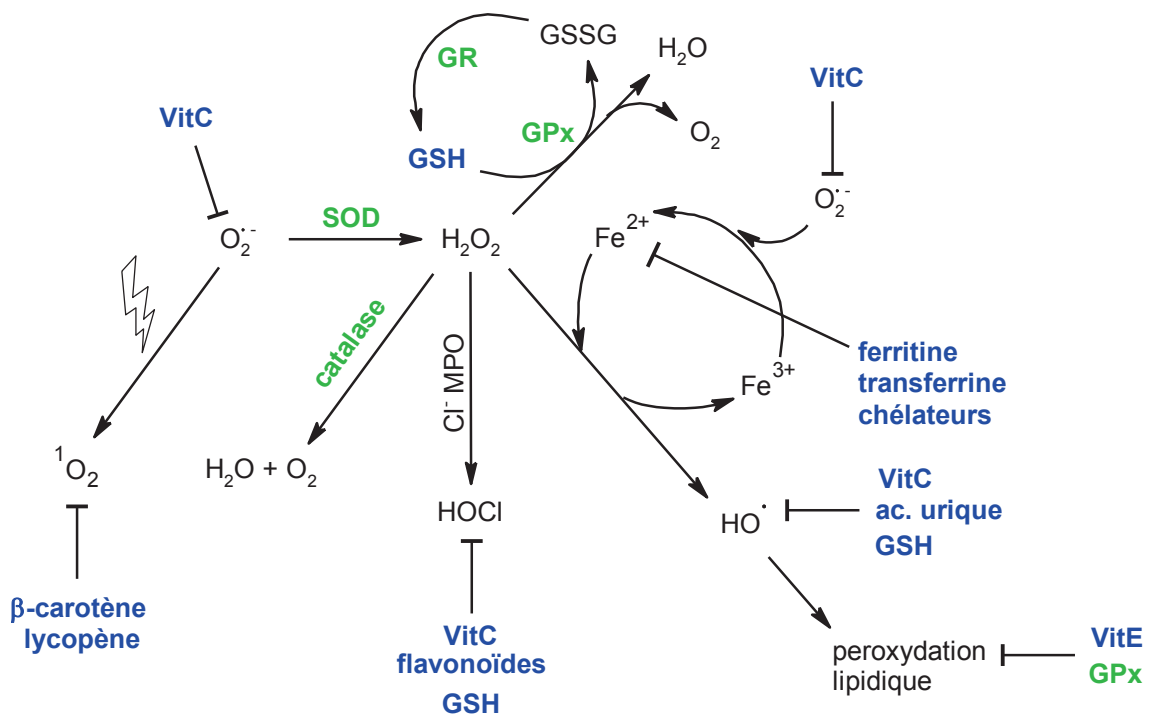


Figure I.35 : Production d'espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydant **enzymatiques** et **non enzymatiques** (adapté de Pincemail *et al.*, 2002 ; Valko *et al.*, 2007).

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

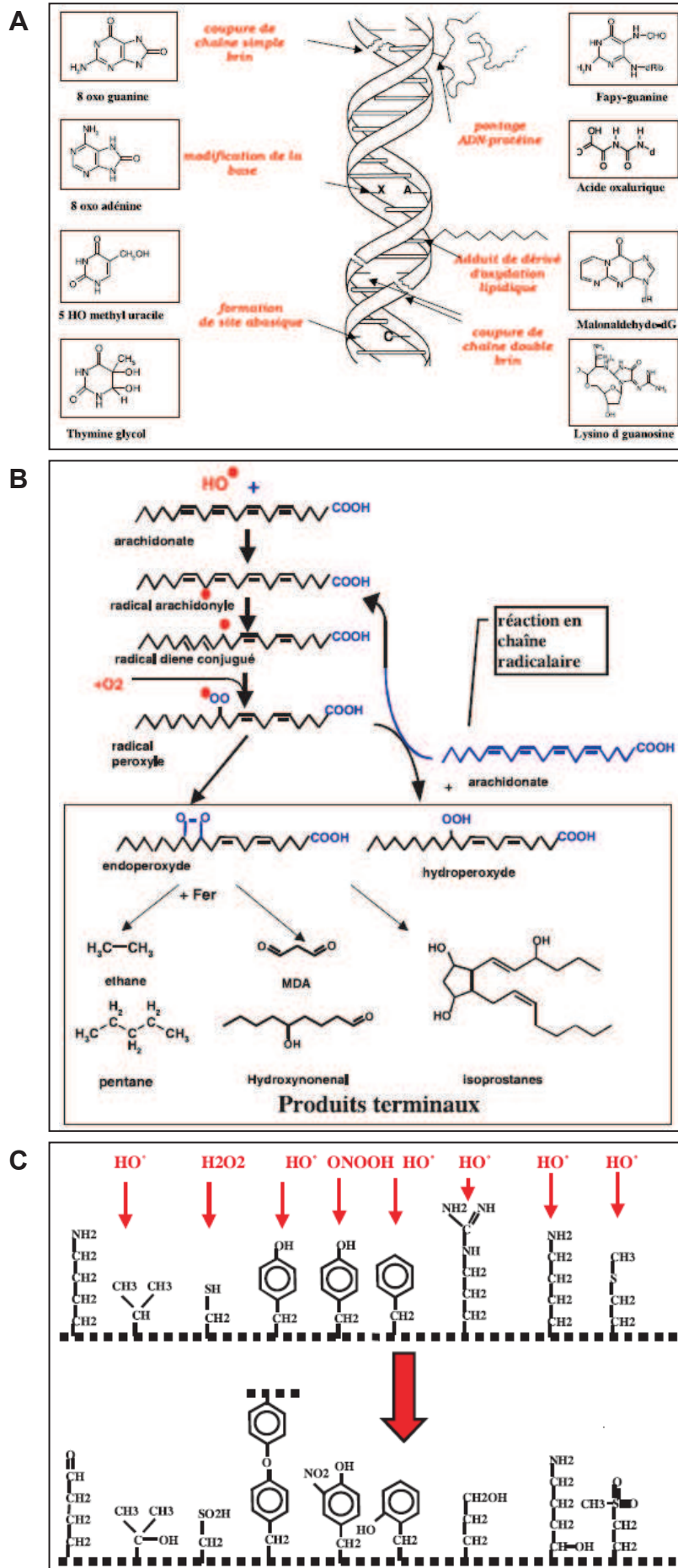


Figure I.36 : Conséquence des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN (A), les lipides (B) et les protéines (C) (Favier, 2003).

3.1.3. Stress oxydant et PM_{2.5}

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.*, 2013). Le stress oxydant induit par la formation de ces ROS 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.

3.1.3.1. 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 granite (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 taille, 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 I.37). 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).

3.1.3.2. Métaux

Certains métaux de transition contenus dans 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 d'Haber-Weiss (réaction de Fenton) (Novo and Parola, 2008) (Figure I.38).

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). Le cadmium agirait en diminuant les

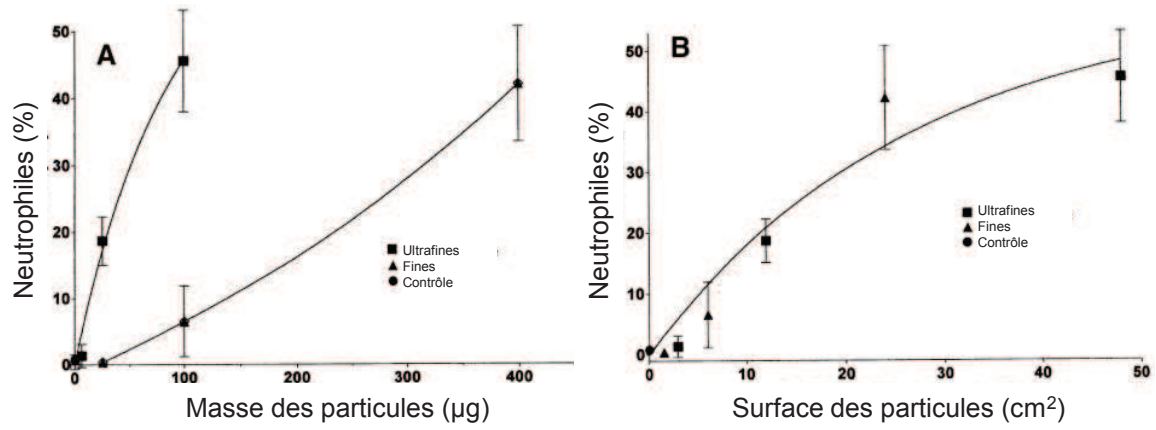


Figure I.37 : Réponse inflammatoire pulmonaire chez le rat, en fonction de la masse (A) et de la surface spécifique (B) des particules (d'après Oberdörster *et al.*, 2000).

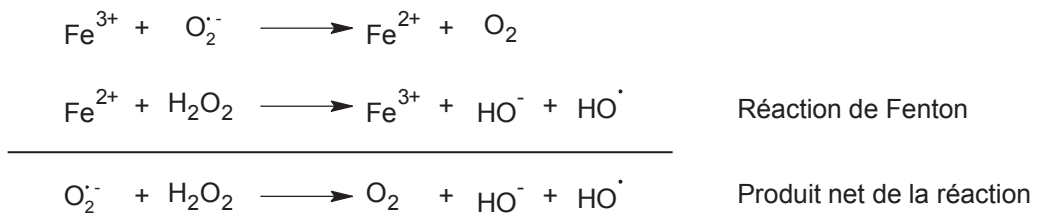


Figure I.38 : Production de ROS par la réaction d'Haber-Weiss dépendante du fer (d'après Kehrer, 2000).

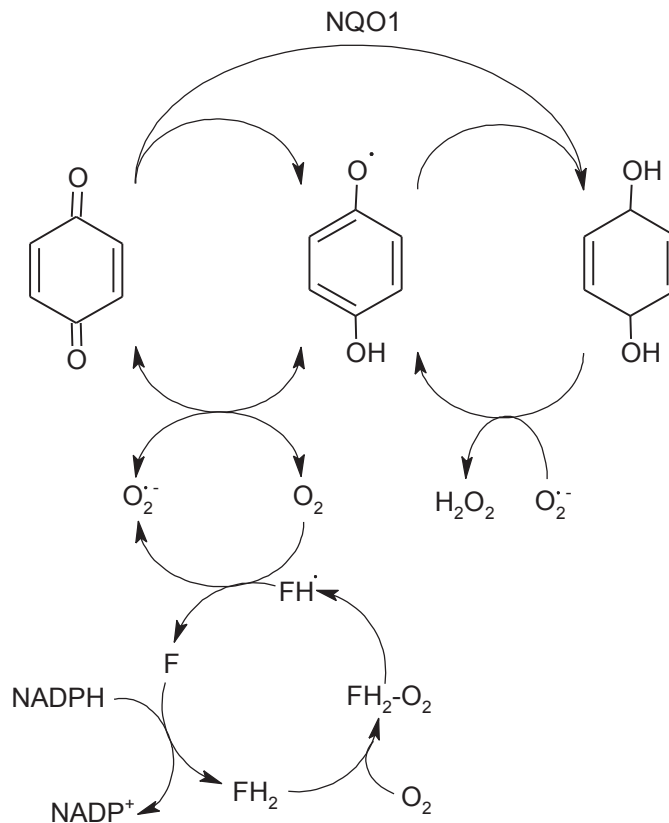


Figure I.39 : Cycle redox des quinones (d'après Kehrer, 2000).
F : enzyme contenant une flavine ; *NQO1* : NADPH-Quinone Oxydoréductase 1.

concentrations intracellulaires en glutathion ou en réduisant les activités SOD, catalase, ou GPx (Del Carmen *et al.*, 2002; El-Maraghy *et al.*, 2001).

3.1.3.3. Fraction organique

Des ROS peuvent être produites par les Cytochromes P450 (CYP), impliqués dans la métabolisation des composés organiques, au cours de cycles catalytiques incomplets. 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 (voir le sous-chapitre suivant pour plus de détails), sont capables de générer des ROS via un phénomène de « cycle redox » (Dellinger *et al.*, 2001) (Figure I.39).

3.2. Activation métabolique

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.

Ce sous-chapitre sera dédié à la description des voies générales de métabolisation des xénobiotiques, à l'étude plus spécifique de la transformation de certaines familles de composés retrouvés dans les PM_{2.5}, ainsi qu'aux mécanismes de régulation de l'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques.

3.2.1. Métabolisation des xénobiotiques

La biotransformation des xénobiotiques a pour objectif 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 à la phase I, II ou III (Figure I.40). 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.

3.2.1.1. Fonctionnalisation

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 et dont l'une des classes fonctionnelles (FC-X) est spécialisée dans la détoxification des xénobiotiques (Gotoh, 2012). La fonctionnalisation du xénobiotique peut également être assurée par une Alcool DésHydrogénase (ADH), une AldoKétoRéductase (AKR), l'Epoxyde Hydrolase microsomale (EHm), ou encore la NADPH-Quinone Oxydo-réductase 1 (NQO1).

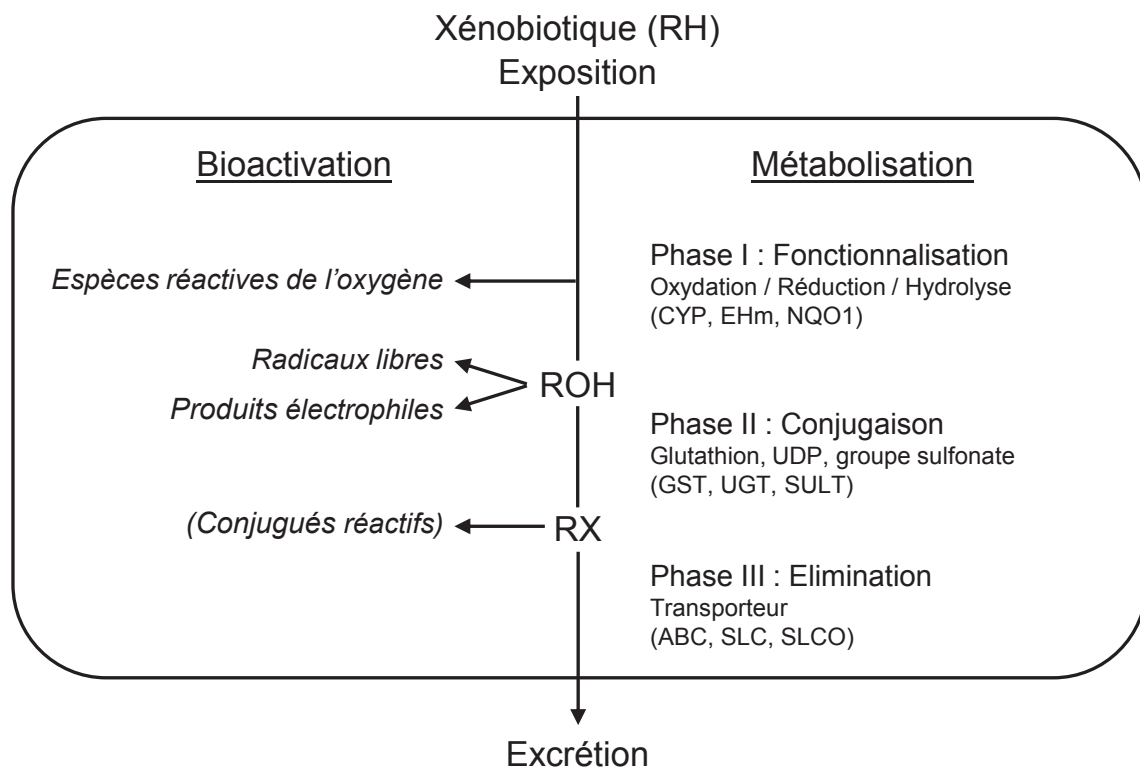


Figure I.40 : Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques (d'après Ding et Kaminsky, 2003 ; Castell *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2005).

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.

3.2.1.2. Conjugaison

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 sulfonate par les SULfo-Transférases (SULT). La conjugaison du xénobiotique rend ce dernier plus hydrosoluble, facilitant ainsi son élimination.

3.2.1.3. Elimination

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 excrété des cellules pour être ensuite éliminés, par la voie urinaire, biliaire, ou via les fèces (Castell *et al.*, 2005).

3.2.2. Activation métabolique de composés spécifiques

Comme nous l'avons vu précédemment, différents composés organiques peuvent entrer dans la composition des PM_{2,5}, tels que des HAP, COV, PCDD/F ou encore 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 dans l'organisme via des enzymes spécifiques. Au cours de cette transformation, un phénomène de bioactivation peut avoir lieu, principalement sous l'action d'enzymes de phase I. Les métabolites produits peuvent éventuellement être neutralisés par conjugaison, mais un excès de métabolites réactifs peut néanmoins être généré, car les enzymes de phase II sont généralement moins inductibles que celles de phase I. Ce type de 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 les protéines ou les lipides.

3.2.2.1. 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 (Figure I.41). 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).

3.2.2.2. COV

La métabolisation des COV, dont le composé type est le benzène, peut également donner lieu à la production de métabolites réactifs (Figure I.42). 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).

3.2.2.3. PCB

L'activation métabolique des PCB n'est que faiblement documentée. Cependant, il a été montré que leur métabolisation peut aboutir à la formation de quinones toxiques, capables de former des adduits à l'ADN (Pereg *et al.*, 2002). La métabolisation des PCB 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.*, 2013). 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) (Daidoji *et al.*, 2005).

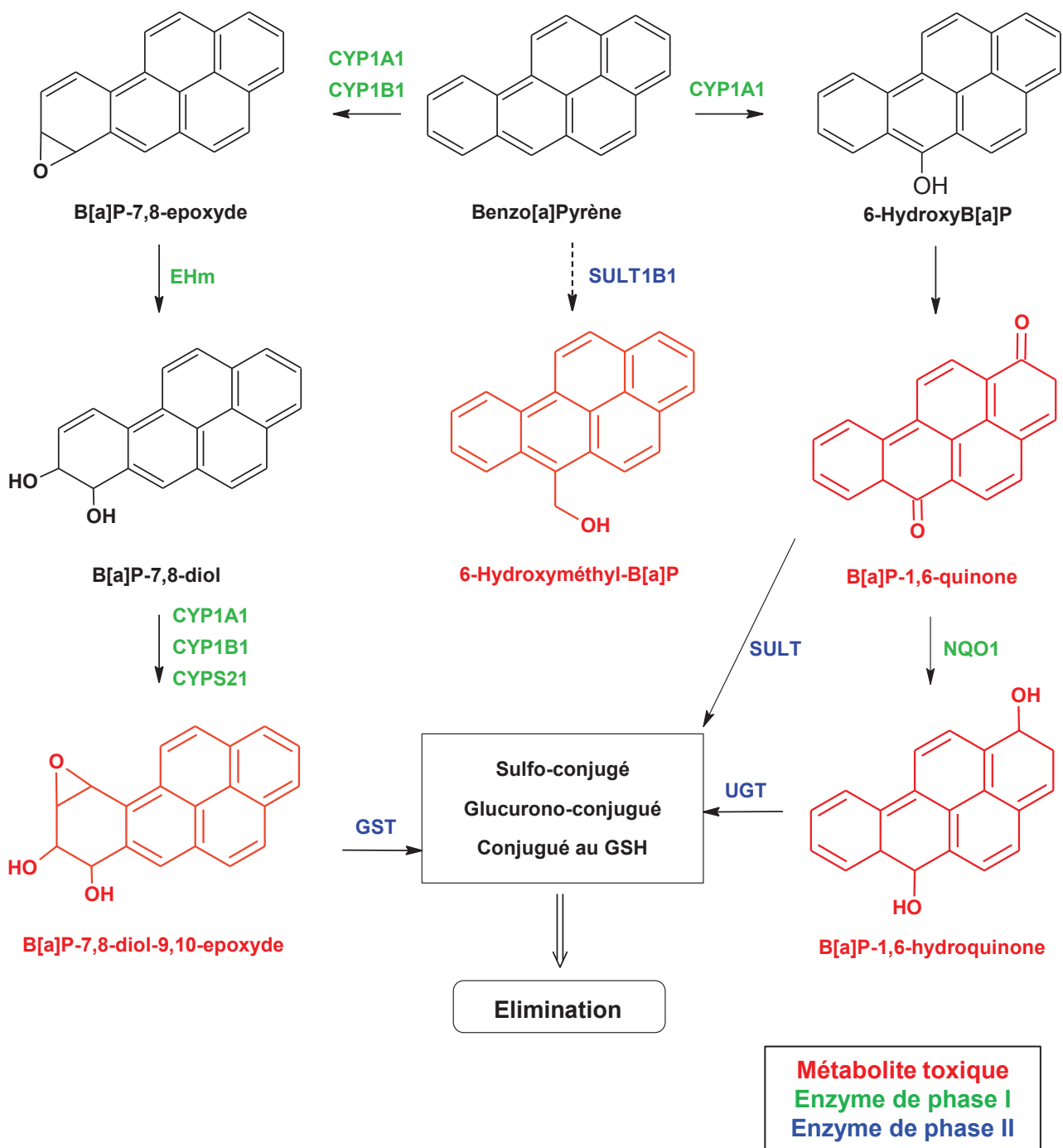


Figure I.41 : Voies de métabolisation du Benzo[a]Pyrène, représentation partielle (d'après Bui et al., 2009 ; Castell et al., 2005 ; Shimada, 2006 ; Teubner et al., 2002).

B[a]P : Benzo[a]Pyrène ; *CYP* : Cytochrome P450 ; *EHm* : Epoxyde Hydrolase microsomale ; *GST* : Glutathion-S-Transférase ; *SULT* : SulfoTransférase ; *UGT* : UDP-GlucuronosylTransférase ; *NQO1* : NADPH-Quinone Oxydoréductase 1.

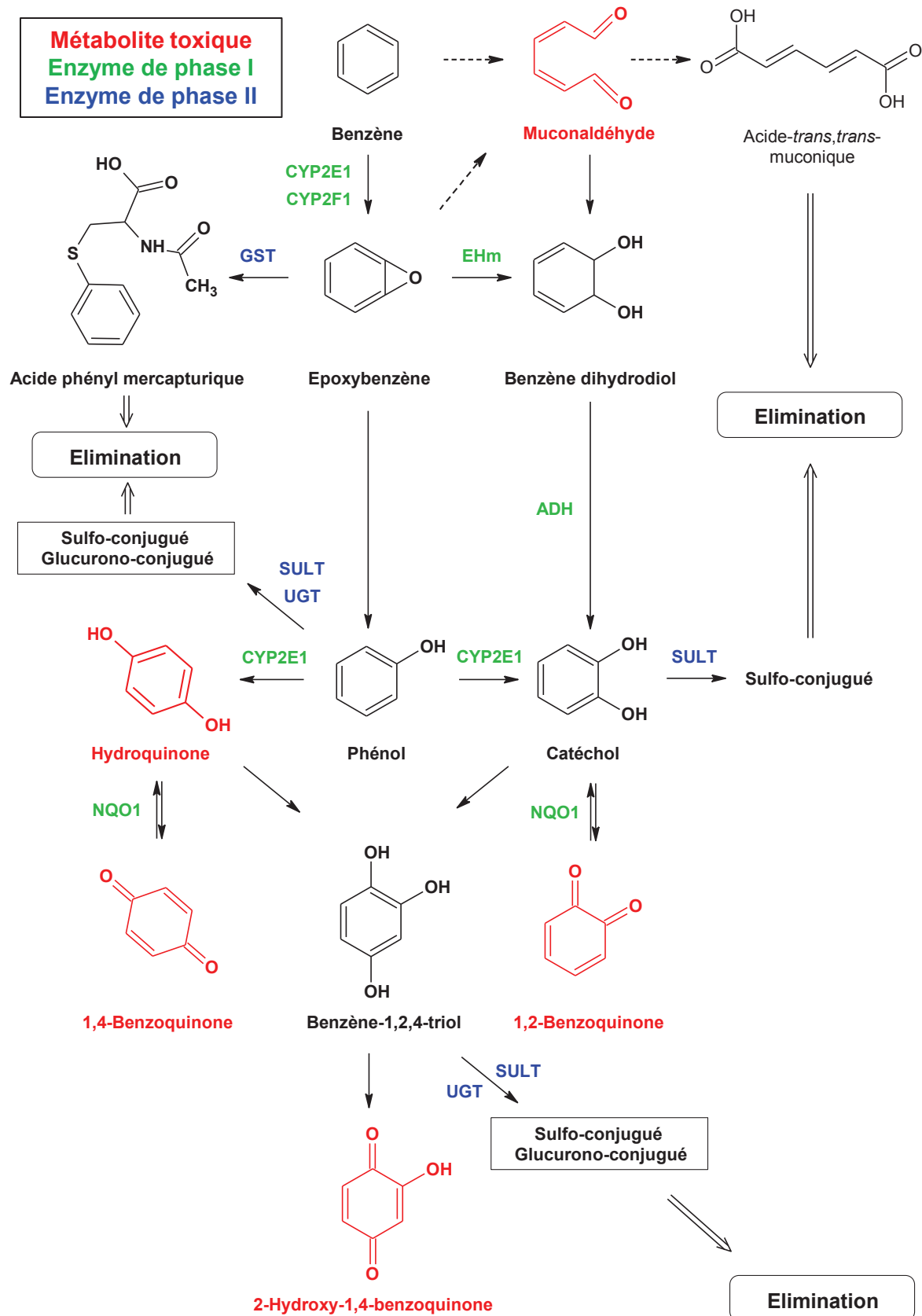


Figure I.42 : Voies de métabolisation du benzène, représentation partielle (d'après Bauer *et al.*, 2003 ; Latriano *et al.*, 1986 ; Snyder et Hedli, 1996 ; Yasuda *et al.*, 2007).
 CYP : Cytochrome P450 ; GST : Glutathion-S-Transférase ; ADH : Alcool DésHydrogénase ; SULT : SulfoTransférase ; UGT : UDP-GlucuronosylTransférase ; NQO1 : NADPH-Quinone Oxydoréductase 1.

3.2.3. Modulation de l'expression des EMX par les xénobiotiques

Le niveau d'expression de certaines EMX peut être modulé par différents xénobiotiques, qu'ils en soient ou non le substrat.

L'exemple le plus fréquemment décrit est la voie de l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) (Figure 1.43). Cette signalisation est déclenchée par la fixation d'un xénobiotique inducteur sur l'AhR cytoplasmique, déclenchant sa translocation dans le noyau où il s'hétérodimérise avec l'Aryl Receptor Nuclear Translocator (ARNT). L'hétérodimère ainsi formé se fixe sur les Xenobiotic Responsive Element (XRE) présents au niveau du promoteur de certains gènes dont il induit l'expression. Ce mécanisme est régulé par l'Aryl hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) agissant comme répresseur de l'AhR, en entrant en compétition avec lui pour l'hétérodimérisation avec l'ARNT et la fixation sur les XRE (Denison and Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2011).

La voie AhR peut être induite par les HAP, les PCDD ou encore certains PCB dioxin-like (Denison and Nagy, 2003; Shimada, 2006). Elle conduit à l'induction de différents gènes cibles, parmi lesquels les *CYP 1A1* et *1B1* (Nebert *et al.*, 1993; Rushmore and Kong, 2002), l'*UGT1A6* (Bock *et al.*, 1998), ou encore l'*ABCB6* (Chavan and Krishnamurthy, 2012). En outre, il semblerait que le B[a]P, en plus d'activer l'AhR, provoque une inhibition de l'expression de l'*AhRR*, renforçant ainsi son effet inducteur (Niestroy *et al.*, 2011).

En plus des XRE présents dans les promoteurs de différentes EMX, il a été montré que l'AhR était capable d'interagir directement avec le promoteur de *NRF2* (Miao *et al.*, 2005). Ce facteur de transcription induit l'expression de ses gènes cibles en se fixant sur les Antioxydant Responsive Elements (ARE) (Hayes and McMahon, 2001). Parmi les cibles de NRF2 figurent les gènes codant pour différentes enzymes de phase II et/ou impliquées dans la réponse au stress oxydant, tels que la NQO1, les GST A1, M1 et P1, ou encore l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Alam *et al.*, 2000; Jaiswal, 2000; Kitteringham *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2001; Rushmore *et al.*, 1990).

La signalisation par l'AhR jouerait un rôle prépondérant dans la cancérogénicité des particules atmosphériques, comme le montre l'absence de formation de tumeur après exposition à des extraits organiques de particules atmosphériques d'origine urbaine dans des souris AhR^{-/-} (Matsumoto *et al.*, 2007). Il existe cependant d'autres voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'expression des EMX, qui pourrait favoriser l'activation métabolique de certains composés. Ainsi, certains HAP sont capables d'induire le *CYP3A4*, intervenant également dans la transformation du B[a]P-7,8-Diol en B[a]P-7,8-Diol-9,10-Epoxyde (BPDE), via le Pregnane X Receptor (PXR) (Luckert *et al.*, 2013).

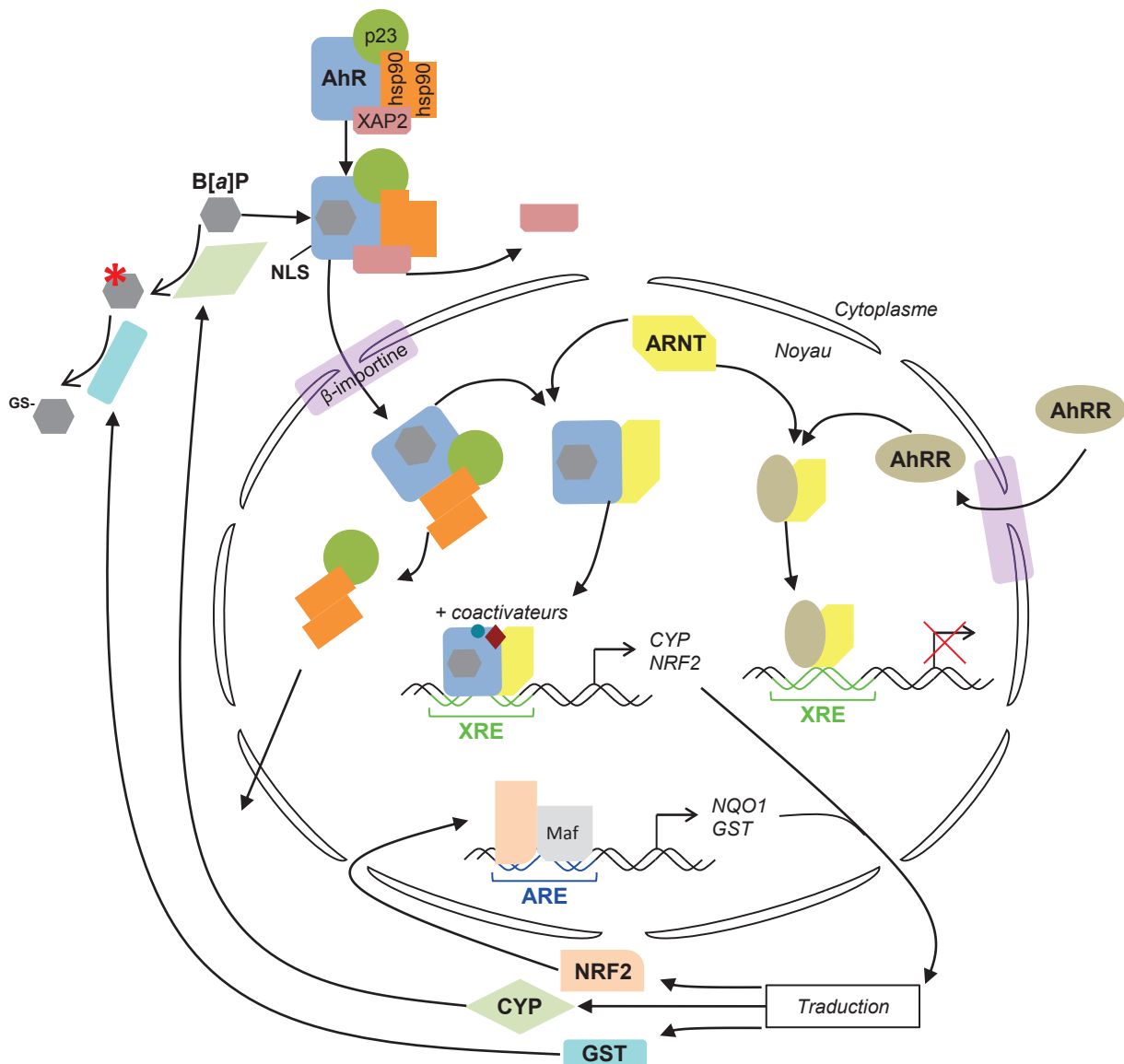


Figure I.43 : Signalisation par l'AhR (adapté de Castell *et al.*, 2005 ; Denison *et al.*, 2011 ; Miao *et al.*, 2005).

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor ; AhRR : Aryl hydrocarbon Receptor Repressor ; ARE : Antioxydant Responsive Element ; ARNT : AhR Nuclear Translocator ; B[a]P : Benzo[a]Pyrène ; CYP : Cytochrome P450 ; GST : Glutathion-S-Transférase ; NLS : Nuclear Localization Signal ; NQO1 : NADPH-Quinone Oxydoréductase 1 ; NRF2 : Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2 ; XRE : Xenobiotic Responsive Element.

3.3. Lésions et réparation de l'ADN

Les mécanismes de stress oxydant et d'activation métabolique décrits ci-dessus peuvent être à l'origine d'espèces réactives qui, comme nous l'avons brièvement évoqué, sont capables d'interagir avec différentes macromolécules cellulaires. Ces interactions sont susceptibles de conduire, de manière directe ou indirecte à des lésions du génome, qualifiées alors de lésions génotoxiques. Ces altérations de l'ADN, si elles ne sont pas réparées ou si la réparation est erronée, peuvent conduire à l'apparition de mutations au niveau des gènes, des chromosomes ou du génome.

Ce sous-chapitre sera consacré à la description de différents effets génotoxiques directs et indirects, de l'implication des PM_{2.5} ou de certains de leurs composants dans leur apparition, ainsi que des mécanismes de réparation de l'ADN.

3.3.1. Génotoxicité directe associée aux PM_{2.5}

Un effet direct est généralement associé à un caractère électrophile de l'agent génotoxique, qui interagit avec l'ADN, nucléophile, donnant lieu à la formation d'adduits, de pontages, ou encore de cassures de l'ADN (Sorsa, 2011).

3.3.1.1. Génotoxicité liée aux espèces oxydantes

Nous avons vu dans un chapitre précédent que des ROS pouvaient être générées en surface des particules, par les métaux contenus dans les particules, en tant que sous-produits de la métabolisation de certains composés organiques, ou encore par le phénomène de « cycle redox » associé aux quinones. Ces ROS, et en particulier le radical $\cdot\text{OH}$, peuvent provoquer différentes lésions de l'ADN, que sont des oxydations de bases, la formation de sites abasiques, des cassures de l'ADN ou différents types de pontages (Klaunig *et al.*, 2011). Les lésions induites par les ROS peuvent apparaître isolément ou de manière groupée (*cluster*) (Sedelnikova *et al.*, 2010).

La nature de la lésion dépend de la région du nucléotide touchée par l'attaque radicalaire. Ainsi, un site abasique peut être formé si l'attaque touche la liaison entre la base et le sucre, alors qu'une attaque du désoxyribose peut conduire à la formation d'une cassure simple-brin (Dizdaroglu and Jaruga, 2012). L'oxydation des bases a quant à elle principalement lieu au niveau des atomes d'oxygène et d'azote, et peut donner lieu à la formation d'un grand nombre de bases modifiées (Cooke *et al.*, 2003; Misra and Waalkes, 2011) (Figure I.44). La

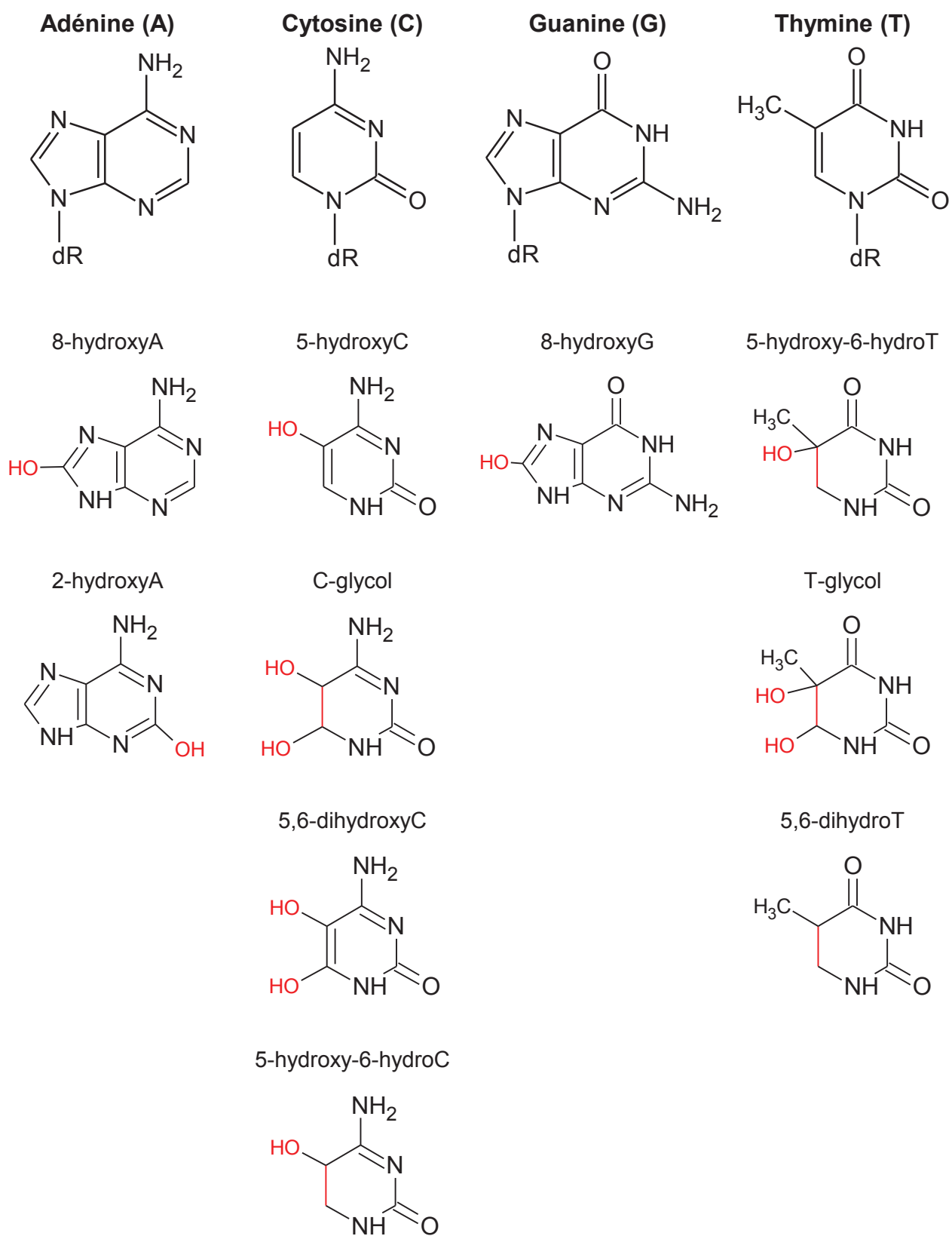


Figure I.44 : Bases de l'ADN et modifications par les espèces réactives de l'oxygène (d'après Cooke *et al.*, 2003 ; Misra and Walkes, 2011).

modification la plus fréquemment rencontrée est la formation de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), également appelée 8-oxo-dG, formée par l'oxydation de la guanine en position C⁸ (Klaunig and Kamendulis, 2004). La formation de ce type d'adduit a ainsi été décrite après exposition à des PM_{2.5} dans différents modèles *in vitro* (André *et al.*, 2011; Dergham *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2011; Vattanasit *et al.*, 2013), *in vivo* (Lei *et al.*, 2005), mais également dans de nombreuses études épidémiologiques où la 8-OHdG est utilisée comme biomarqueur urinaire de stress oxydant (Bollati *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012). Les adduits de type 8-OHdG, s'ils ne sont pas réparés, peuvent induire des transversions G:C > T:A (Favier, 2003).

Des cassures double-brin de l'ADN peuvent également être induites lorsque :

- deux cassures simple-brin sont formées à faible distance sur des brins opposés ;
- les topoisomérases coupent un brin à proximité d'une cassure sur le brin opposé ;
- les dommages à l'ADN interfèrent avec les systèmes de réplication ou de transcription ;
- deux lésions proches sont réparées simultanément ;
- l'excision d'un nucléotide a lieu à proximité d'une cassure du brin opposé (Sedelnikova *et al.*, 2010).

Ce type de lésions est décrit par certains auteurs comme le plus sérieux, car les cassures double-brin, même en faible nombre, sont suffisantes pour induire des mutations géniques et des aberrations chromosomiques (Khanna and Jackson, 2001).

Enfin, des pontages entre l'ADN et d'autres macromolécules intracellulaires peuvent avoir lieu si ces dernières ont été la cible d'espèces oxydantes. Ainsi, des intermédiaires réactifs issus de l'oxydation des lipides ou des protéines peuvent former des adduits à l'ADN, tels que des adduits MalonDiAldéhyde (MDA, un sous-produit de la peroxydation lipidique) à la guanine ou des liaisons lysino-guanine (Favier, 2003; Klaunig *et al.*, 2011).

3.3.1.2. Génotoxicité directe des HAP

Les HAP peuvent avoir des effets génotoxiques par l'intermédiaires des ROS générés au cours de leur métabolisation, selon les éléments décrits au paragraphe précédent (Ohnishi and Kawanishi, 2002; Park *et al.*, 2006). Les HAP peuvent également être transformés en métabolites électrophiles capables de former directement des adduits encombrants à l'ADN, qui peuvent être à l'origine de mutations en en déformant la structure en double hélice (Ling *et al.*, 2004; Pakotiprapha *et al.*, 2012).

Parmi les métabolites réactifs générés par les enzymes de phase I, le BPDE, issu de la transformation du Benzo[a]Pyrène-7,8-Diol par les CYP, est connu de longue date pour être à l'origine d'adduits encombrants à l'ADN (Sims *et al.*, 1974). L'ouverture du cycle époxy du BPDE conduit à la formation de liaisons covalente avec l'adénine (position N⁶) ou la guanine (en position N²). Les adduits BPDE-dA s'intercalent entre les paires de bases, alors que les adduits BPDE-dG se localisent au niveau du sillon mineur de l'ADN ou s'intercalent en provoquant un déplacement de base (Ling *et al.*, 2004) (Figure I.45).

Les quinones formées lors de la métabolisation des HAP sont également capables de former des adduits encombrants à l'ADN. Le benzo[a]pyrène-7,8-dione une orthoquinone produite par la transformation du benzo[a]pyrène-7,8-diol par les AKR (Flowers-Geary *et al.*, 1995), est ainsi capable de former des adduits à l'ADN, principalement sur la guanine (Balu *et al.*, 2004; McCoull *et al.*, 1999; Shou *et al.*, 1993), mais également sur l'adénine (Balu *et al.*, 2004) et la cytosine (Balu *et al.*, 2006). Le B[a]P n'est cependant pas le seul HAP à être métabolisé en quinones réactives, comme l'a montré la formation d'adduits par le naphthalène-1,2-dione ou le phénanthrène-1,2-dione en position N⁷ de la guanine. Quel que soit le HAP initial, cette formation provoque le clivage de la liaison glycosidique, formant un adduit dépurinant (McCoull *et al.*, 1999).

Comme les lésions formées par les ROS, les dommages causés par les adduits de HAP sont susceptibles d'interférer avec les mécanismes de réparation ou de réplication de l'ADN, conduisant potentiellement à la formation de cassures double-brin (Sedelnikova *et al.*, 2010).

3.3.2. Mécanismes de réparation de l'ADN

Les lésions décrites précédemment peuvent avoir de graves conséquences sur le génome. En effet, la réplication sans réparation des « microlésions », telles que les adduits d'oxydation, les sites abasiques et les cassures simple-brin peut conduire à des substitutions de paires de bases, ainsi qu'à l'insertion ou la délétion de courts fragments d'ADN. Les « macrolésions » que sont les adduits encombrants à l'ADN, les pontages ou les cassures double-brin, peuvent quant à elles être à l'origine d'un gain, d'une perte ou d'un réarrangement de fragments importants de chromosomes (Misra and Waalkes, 2011). La réparation de ces lésions est donc indispensable à l'intégrité du génome et est assurée par différents mécanismes de réparation de l'ADN, qui interviennent en fonction du type de lésion. Seuls les processus impliqués dans la réparation des lésions décrites précédemment (sites abasiques, modifications de bases, adduits encombrants, cassures simple- et double-brin) seront décrits ci-dessous.

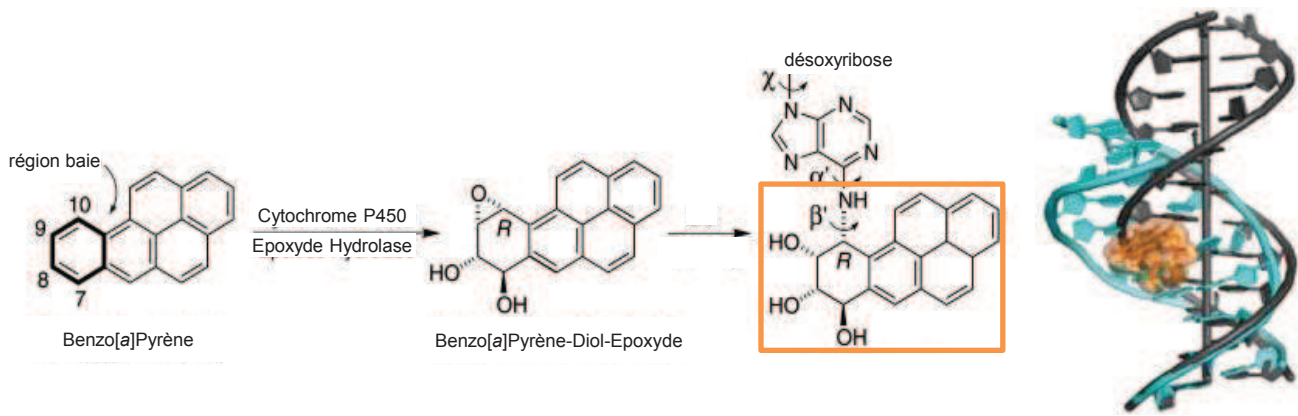


Figure I.45 : Formation d'un adduit benzo[a]pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde (en orange) à l'adénine, mettant en évidence les zones de torsion (lettres grecques) et la déformation de la double hélice d'ADN (en bleu), par rapport à la structure normale (en noir) (d'après Ling *et al.*, 2004 ; Pakotiprapha *et al.*, 2012).

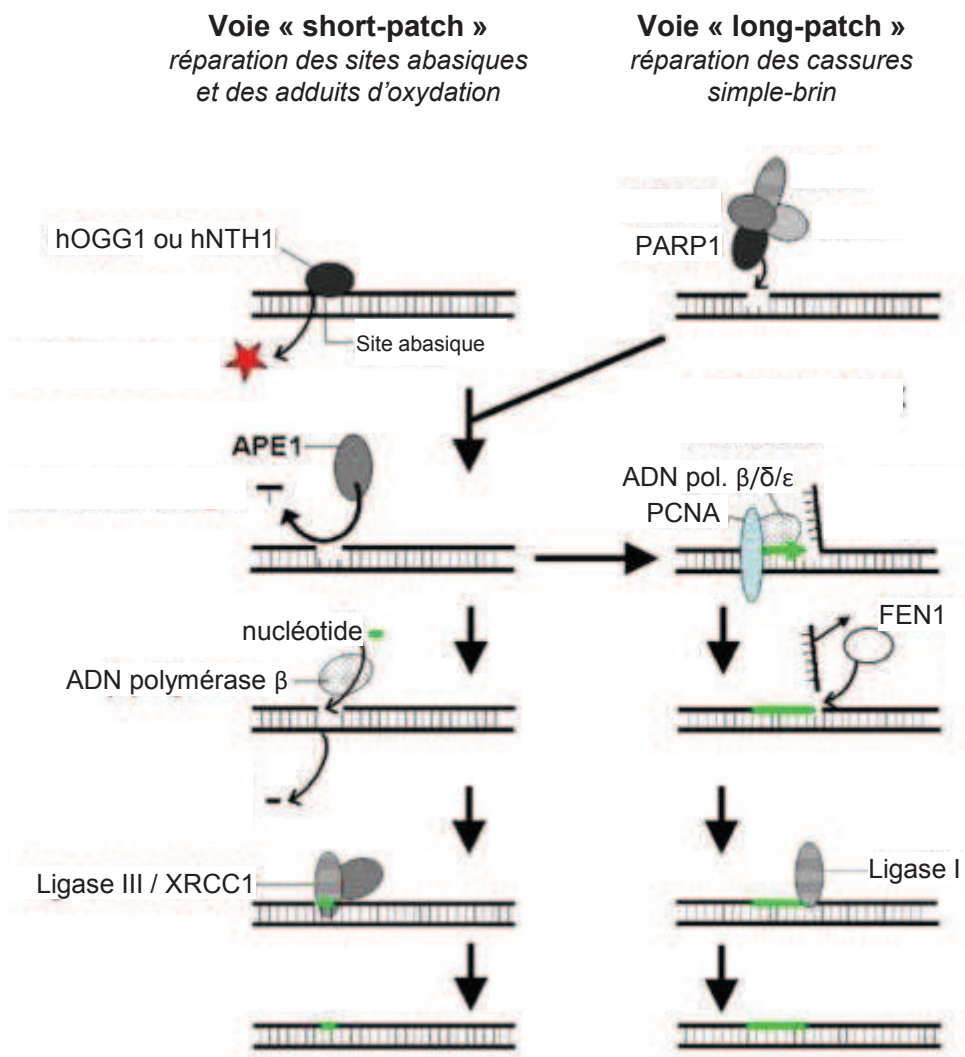


Figure I.46 : Système de réparation par excision de base (BER) (Sedelnikova *et al.*, 2010).

3.3.2.1. Réparation par excision de base

Les sites abasiques et les cassures simple-brin sont pris en charge par l'une des deux voies du système de réparation par excision de base (BER, Base Excision Repair) (Figure I.46).

La voie « *short-patch* » ou « *single nucleotide* » est mise en place pour réparer une base modifiée ou un site abasique. La base modifiée est excisée par une ADN glycosylase (hOGG1 ou hNTH1), formant un site abasique pris en charge par l'endonucléase APE1 qui élimine de désoxyribose, permettant à l'ADN polymérase β de combler la séquence puis au complexe ligase III / XRCC1 de rétablir les liaisons (Sedelnikova *et al.*, 2010).

La voie « *long-patch* » permet quant à elle la réparation des cassures simple-brin. Elle fait initialement intervenir la PARP1 au niveau de la lésion, puis les ADN polymérases β , δ et ϵ ainsi que la protéine PCNA pour la synthèse d'une nouvelle séquence de 2 à 12 nucléotides. Les anciens nucléotides sont déplacés au fur et à mesure de la synthèse, puis excisés par la protéine FEN1. Enfin, la ligase I permet la reformation des liaisons (Rass *et al.*, 2012; Sedelnikova *et al.*, 2010).

3.3.2.2. Réparation par excision de nucléotide

Le système de réparation par excision de nucléotide (NER, Nucleotide Excision Repair) permet l'élimination des lésions bloquantes, telles que les adduits encombrants déformant l'hélice d'ADN (Postel-Vinay *et al.*, 2012; Rass *et al.*, 2012).

Il existe deux voies d'initiation de la NER selon la localisation de la lésion (Figure I.47). La TC-NER, pour NER couplée à la transcription (Transcription-Coupled NER), intervient dans la réparation des lésions localisées sur le brin transcrit d'un gène actif et détectées par l'arrêt de l'ARN polymérase II. La GG-NER, pour NER du génome global (Global Genome NER), intervient dans la réparation des lésions sur le brin non-transcrit ou dans des régions non-codantes de l'ADN, reconnues par les protéines XPC/RAD23B et XPE. Les voies TC-NER et GG-NER se rejoignent après cette étape, lors du recrutement du complexe TFIIH. Ce dernier contient des hélicases (XPB et XPD) qui ouvrent la double hélice d'ADN, puis les endonucléases XPG (en 3') et ERCC1/XPF (5') excisent un oligonucléotide de 27 à 34 bases contenant la lésion. Un nouveau brin est ensuite synthétisé par les ADN polymérases ϵ et δ , avant que l'ADN ligase I ne reforme les liaisons (Lans *et al.*, 2012; Magaldi, 2004; Mladenov and Iliakis, 2011; Postel-Vinay *et al.*, 2012; Rass *et al.*, 2012).

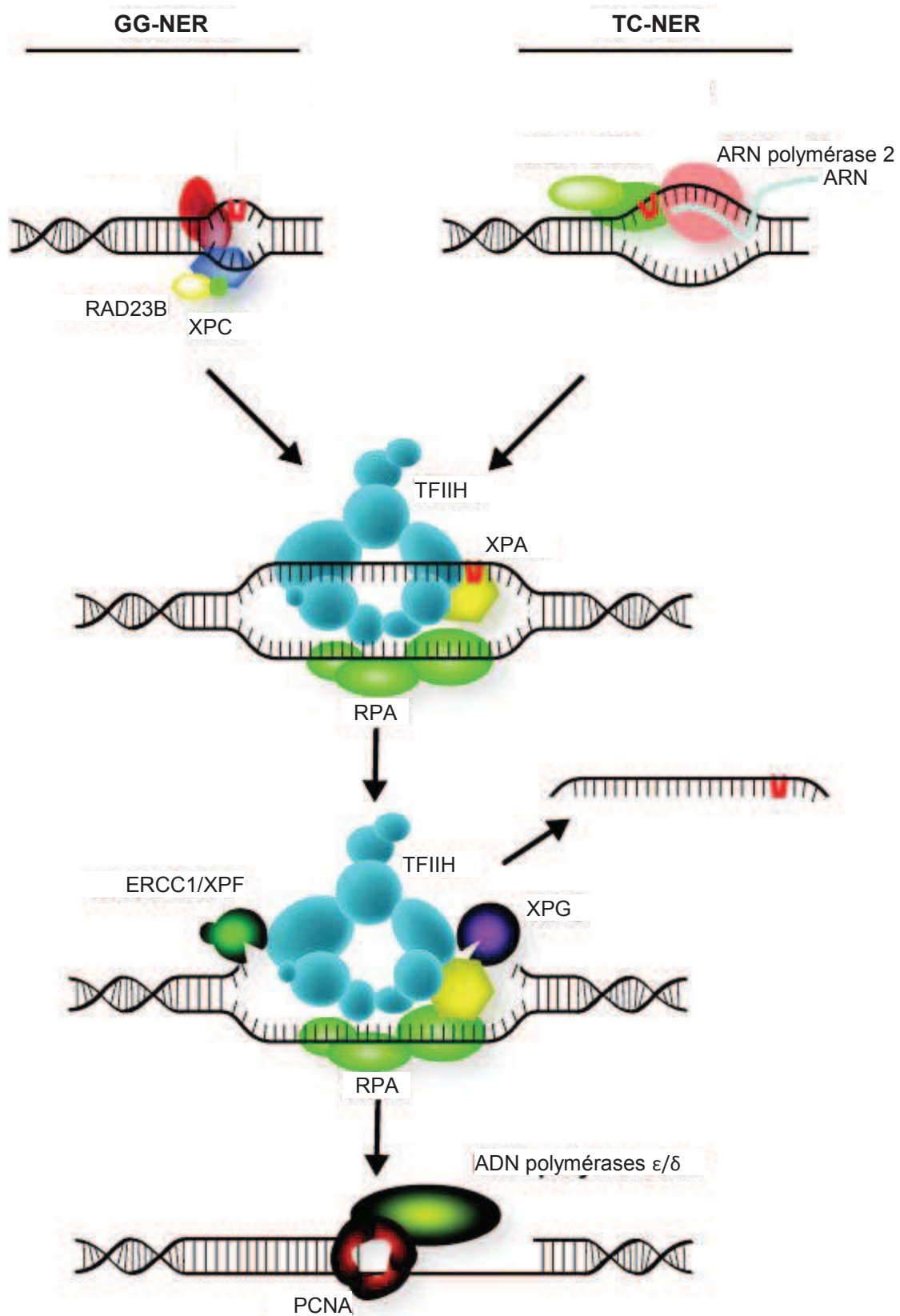


Figure I.47 : Système de réparation par excision de nucléotide (NER) (Lans *et al.*, 2012).
 GG-NER : global genome NER ; TC-NER : transcription-coupled NER.

3.3.2.3. Réparation des cassures double-brin

Les cassures double-brin induisent la phosphorylation du variant H2AX de l'histone H2A en position sérine 139 (Rogakou *et al.*, 1998), permettant ensuite leur réparation par deux mécanismes : la recombinaison homologue (HR, Homologous Recombination) et la religature d'extrémités non-homologues (NHEJ, Non-Homologous End Junction) (Figure 1.48). La sélection de l'un ou l'autre de ces mécanismes dépend principalement de la phase du cycle cellulaire.

Ainsi, la HR, qui implique l'utilisation de la séquence homologue présente sur la chromatide sœur ne peut avoir lieu que lors des phases S ou G2 du cycle cellulaire. Ce mécanisme permet une réparation sans erreur et fait intervenir différentes protéines, dont les principales sont le complexe MRN et CtIP, qui initient la résection d'ADN avant le recrutement d'ExoI permettant la formation d'une extrémité sortante simple-brin, ensuite couverte par la protéine RPA, elle-même déplacée par BRCA2 puis remplacée par Rad51. Ce brin est impliqué dans la recherche d'homologie de séquence, qui une fois localisée permet la réparation et la resynthèse d'ADN par l'intermédiaire des résolvases (Mladenov and Iliakis, 2011; Rass *et al.*, 2012). Comme dans le cas d'une NER, les ADN polymérases ϵ et δ , ainsi que l'ADN ligase I, sont impliquées dans la synthèse et la religature de l'ADN (Postel-Vinay *et al.*, 2012).

A l'inverse, la NHEJ n'est pas basée sur une homologie de séquence et génère des mutations. Ce mécanisme implique la reconnaissance des extrémités par le complexe Ku70/Ku80, puis par ADN-PKs qui, une fois activée, permet le recrutement du complexe XRCC4/ligase IV afin de ligaturer les extrémités libres (Rass *et al.*, 2012).

3.3.3. Génotoxicité indirecte

Des atteintes de l'ADN peuvent également survenir de manière indirecte, suite à l'altération de différents systèmes intracellulaires tels que systèmes de réparation de l'ADN, les télomérases, ou encore le fuseau mitotique (Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

3.3.3.1. Réparation de l'ADN

Il semble que les PM_{2.5} ou certains de leur composants puissent être à l'origine de perturbations des systèmes de réparation de l'ADN. Les données disponibles font état d'altérations fréquentes et spécifiques du système NER, alors qu'il n'existe que peu d'information concernant les autres systèmes de réparation.

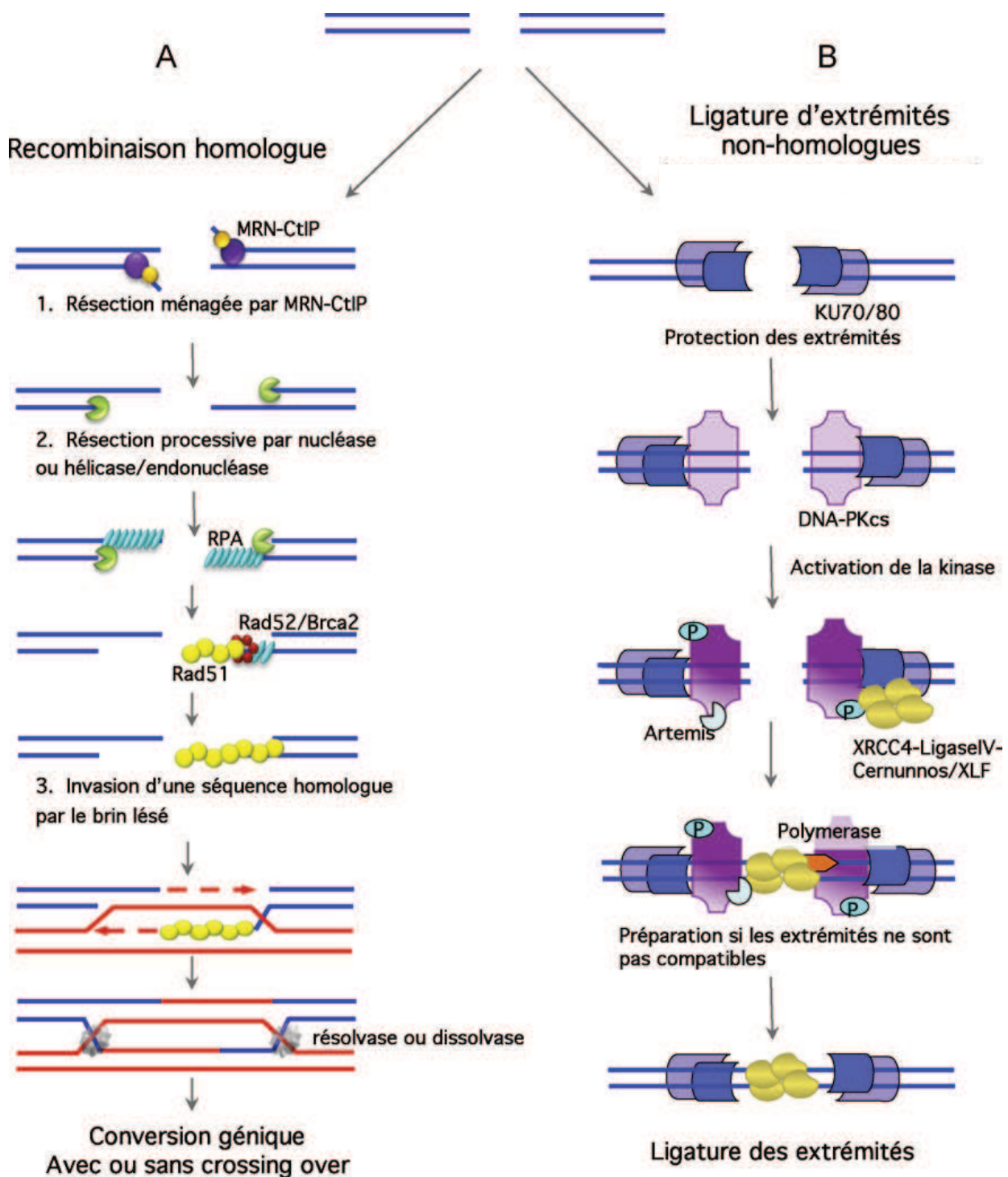


Figure I.48 : Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (Rass *et al.*, 2012).

Le système NER peut ainsi être perturbé par différents métaux et métalloïdes, tels que le cadmium II (Schwerdtle *et al.*, 2010), le nickel II (Hu *et al.*, 2004a), le chrome VI (Hu *et al.*, 2004b), l'antimoine (Grosskopf *et al.*, 2010), ou encore l'arsenic sous forme d'acide monométhylarsonique (Shen *et al.*, 2008). Il semble que ce dysfonctionnement soit lié à la capacité des métaux à interagir avec les ions zinc ou magnésium contenus dans certaines protéines (Mateuca *et al.*, 2006). La fonctionnalité de la protéine P53 permettant la détection des dommages à l'ADN est particulièrement affectée, conduisant à une diminution de la transcription de la protéine XPC après exposition au cadmium et de la protéine XPE par l'exposition à l'antimoine, toutes deux nécessaires au bon fonctionnement du système NER (Adimoolam and Ford, 2003; Ford, 2005; Grosskopf *et al.*, 2010; Schwerdtle *et al.*, 2010). Il semble également que le domaine à doigt de zinc de la protéine XPA puisse être altéré par certains métaux et métalloïdes, perturbant son assemblage et sa dissociation avec l'ADN lésé (Grosskopf *et al.*, 2010; Schwerdtle *et al.*, 2010). Le système NER peut aussi être altéré par deux sous-produits de la peroxydation lipidique, susceptible d'être initiée par les ROS produits par les métaux et les composés organiques, que sont le MDA (Feng *et al.*, 2006) et le *trans*-4-hydroxy-2-nonenal (Feng *et al.*, 2004). Enfin, il a été démontré que des cellules A549 exposées à des PM_{2.5} voyaient leur capacité de réparation NER diminuée de manière proportionnelle à la dose de particules (Mehta *et al.*, 2008).

Alors que de nombreuses études mettent en évidence des altérations du système NER, les données concernant le système BER sont plus rares. Il a cependant été montré qu'un excès de fer ou de zinc dans les tissus nerveux pouvait perturber la BER, en altérant l'activité d'APE1, de FEN1 et de l'ADN polymérase β , ainsi que l'étape de ligature (Li *et al.*, 2009). Nous n'avons pu identifier d'autres études ayant évalué l'impact des PM_{2.5}, des HAP, ou d'autres métaux sur la BER dans des cellules pulmonaires.

Les PM_{2.5}, de part leur contenu en certains métaux et métalloïdes, semblent donc capables de perturber les systèmes de réparation de l'ADN, diminuant de fait la réparation des lésions directes qu'elles engendrent.

3.3.3.2. Télomérases

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la télomérase est une reverse transcriptase spécifique chargée de maintenir la longueur des télomères en répliquant l'hexanucléotide TTAGGG. Elle est constituée d'une sous-unité composée d'ARN (TR) ainsi que d'une sous-unité catalytique appelée TELomerase Reverse Transcriptase (TERT), auxquelles sont associées différentes protéines accessoires (Wyatt *et al.*, 2010) (Figure I.49). Le rôle joué par la télomérase dans la cancérogenèse est ambivalent, car sa surexpression comme sa

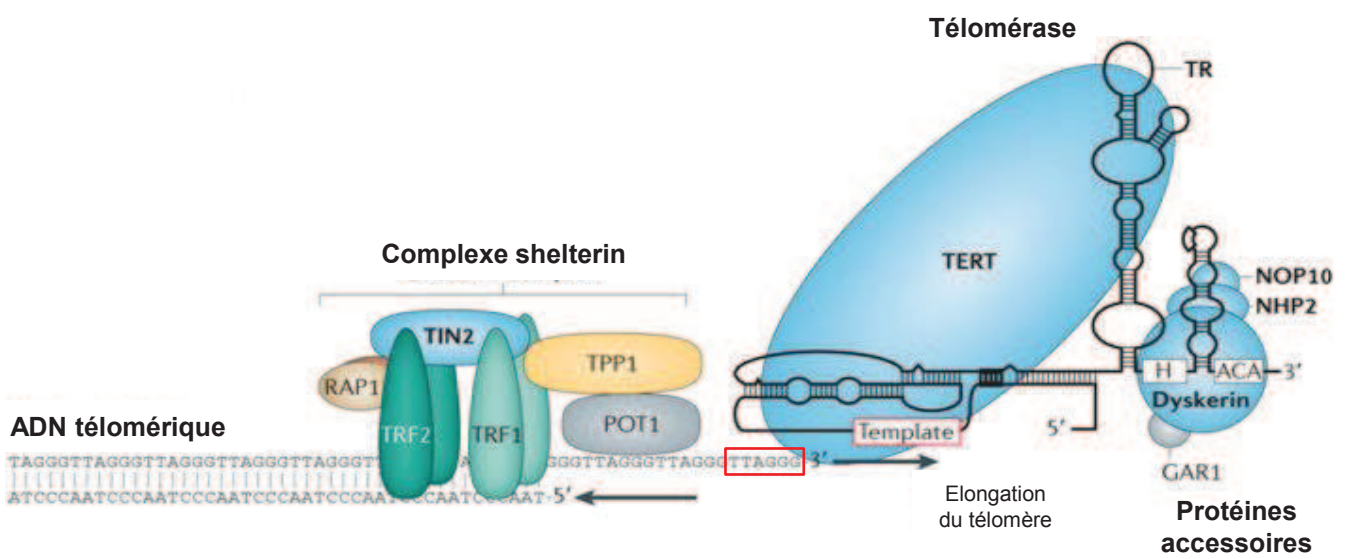


Figure I.49 : Structure du télomère et de la télomérase (adapté de Armanios and Blackburn, 2012).

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 à 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).

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 à été décrit (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 pris isolément, le cadmium semble induire une augmentation de l'activité télomérase dans les hépatocytes de rat (Dai *et al.*, 2010). Il semblerait également que la TCDD puisse favoriser une diminution de l'activité télomérase dans certaines conditions (Fiorito *et al.*, in press).

Malgré ces données inconstantes, il apparaît légitime de penser que les PM_{2.5} sont susceptibles de modifier l'activité télomérase dans les cellules exposées, modulation qui pourrait avoir des conséquences délétères en termes d'instabilité génomique ou d'immortalisation cellulaire.

3.3.3.3. Fuseau mitotique

Le fuseau mitotique permet la séparation des chromosomes entre les deux cellules filles au cours de la mitose (Figure I.50). Il est formé de microtubules émanant des deux centrosomes, formés chacun d'une paire de centrioles obtenue par duplication des centrioles mère. Les microtubules du fuseau se lient avec les chromosomes au niveau des kinétochores (Figure I.51), permettant ainsi la séparation des chromatides sœurs par un éloignement des centrosomes associé à un raccourcissement des microtubules du kinétochore (Alberts *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de métaux et métalloïdes à perturber les microtubules. L'arsenic, le cadmium (CdCl₂ ou CdSO₄), le chrome (CrCl₃ ou Cr₂K₂O₇) et le nickel (NiCl₂ ou NiSO₄) sont ainsi capables d'interférer avec le fuseau mitotique, conduisant

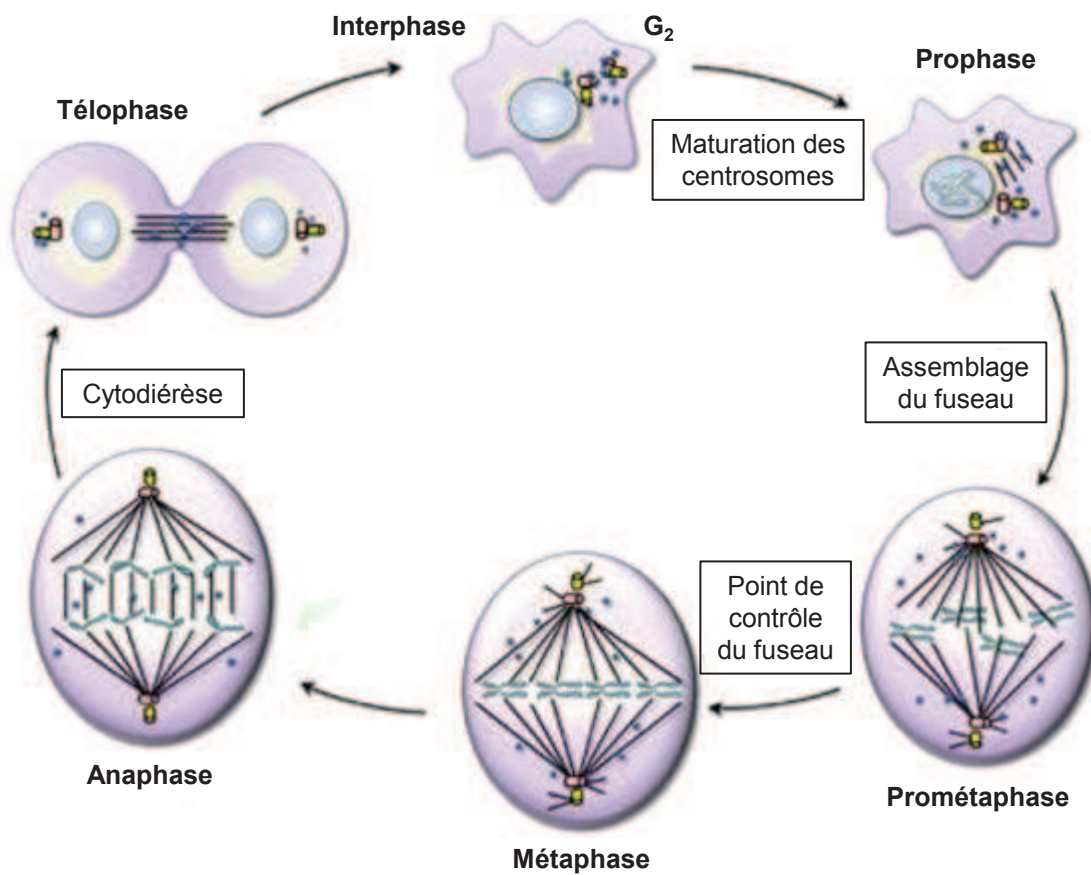


Figure I.50 : Formation du fuseau mitotique (adapté de Li and Zhan, 2011).

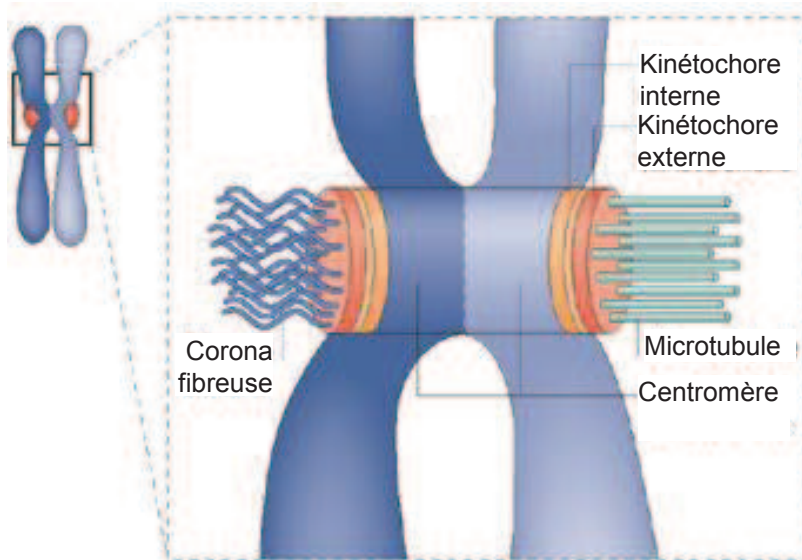


Figure I.51 : Interaction entre les chromosomes et le fuseau mitotique au niveau du kinétochore (d'après Cheeseman and Desai, 2008).

à des anomalies de ségrégation des chromosomes (Rossman, 2003; Seoane and Dulout, 2001). Cet effet génotoxique indirect des métaux pourrait être lié à leur capacité à se fixer au groupement thiol de la tubuline, conduisant à des dysfonctionnements du cytosquelette et à la perte ou la non-disjonction de chromosomes en métaphase (Mateuca *et al.*, 2006), éventuellement associée au contournement du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique induit par certains métaux, comme cela a été démontré pour le chrome VI (Wise *et al.*, 2006). Certains composés organiques induisent également des dommages du fuseau mitotique, comme cela a été montré pour le benzène (Rana and Verma, 2005). Une étude récente a mis en évidence des perturbations du fuseau mitotique suite à l'exposition de cellules BEAS-2B à un échantillon de PM_{2.5}. Les particules induisent la formation de fuseaux tripolaires ou encore plus désorganisés, vraisemblablement liée à une réplication anormale des centrosomes conduisant à leur amplification (Gualtieri *et al.*, 2011) (Figure I.52).

L'ensemble de ces données suggère que les PM_{2.5} seraient capables d'induire des anomalies du fuseau mitotique, qui peuvent être à l'origine d'aneuploïdies liées à des défauts de ségrégation des chromosomes lors de la mitose.

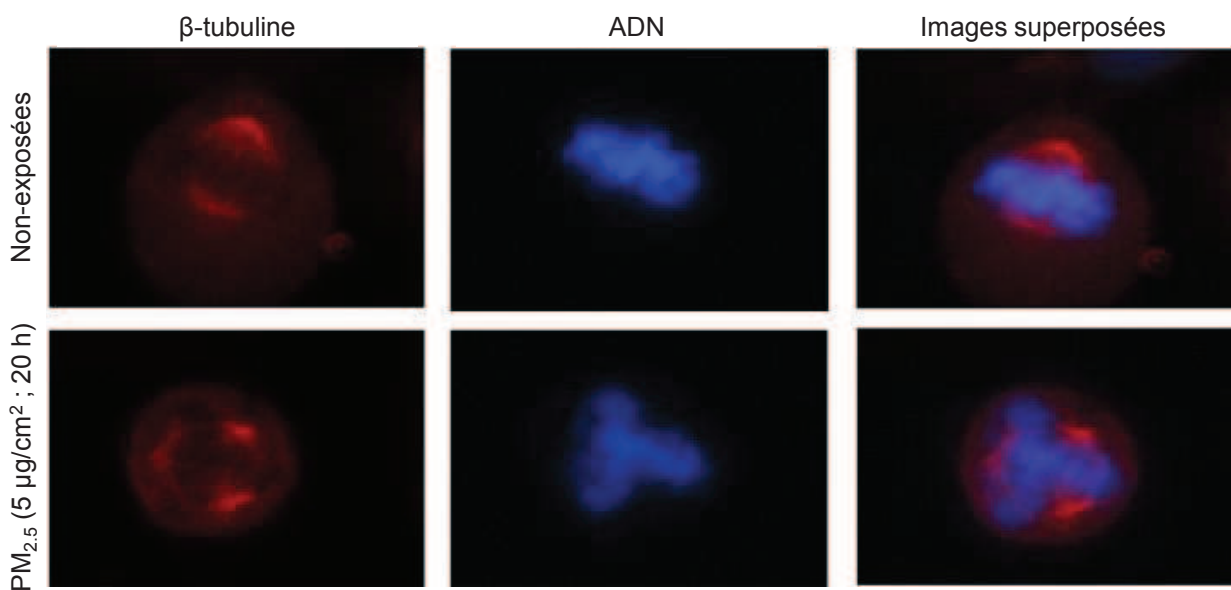


Figure I.52 : Formation d'un fuseau mitotique tripolaire après exposition aux PM_{2.5} (Gualtieri *et al.*, 2011).
 PM : Particulate Matter

3.4. Modifications épigénétiques

Il est maintenant reconnu que le processus de cancérogenèse fait intervenir, en plus des atteintes génotoxiques précédemment décrites, des modifications épigénétiques (Risch and Plass, 2008; Sharma *et al.*, 2010). La définition la plus couramment admise de ces mécanismes est qu'ils conduisent à une modification de l'expression de gènes sans en modifier la séquence (Brambilla, 2009). Trois types de modifications épigénétiques correspondent ainsi à ces critères : la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles d'histones et les miRNA (Esteller *et al.*, 1999a; Kurdistani, 2011; Melo and Esteller, 2011).

Ce sous-chapitre sera consacré à la description de ces trois mécanismes, de leurs conséquences biologiques et de l'effet des PM_{2.5} ou de leurs composants sur certaines modifications sélectionnées.

3.4.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus fréquemment étudiée. Elle joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression génique, en permettant une « extinction » (*silencing*) épigénétique des gènes. La méthylation de l'ADN a lieu sur certaines cytosines spécifiques, localisées au niveau de dinucléotides CpG. Les cytosines méthylées représenteraient 3 à 6 % des cytosines totales de l'ADN humain normal (Esteller, 2007). Les dinucléotides CpG ne sont pas localisés de manière homogène dans tout le génome, mais regroupés au niveau de deux types de zones : les îlots CpG et les séquences répétitives. Le profil de méthylation est établi par l'activité des ADN MéthylTransférases (DNMT, DNA MethylTransferase) *de novo* DNMT3A et DNMT3B, puis transmis grâce à l'activité de la DNMT de maintenance DNMT1 (Sharma *et al.*, 2010) (Figure I.53).

3.4.1.1. Méthylation des îlots CpG

Les îlots CpG sont localisés aux extrémités 5' de nombreux gènes, essentiellement au niveau des promoteurs, et sont globalement non-méthylés dans les cellules normales, en dehors de certains gènes spécifiques méthylés au cours du développement conduisant à leur « extinction » à long terme. Le statut non-méthylé du promoteur permet, en présence des facteurs adéquats, la transcription du gène sous son contrôle (Esteller, 2007; Sharma *et al.*, 2010).

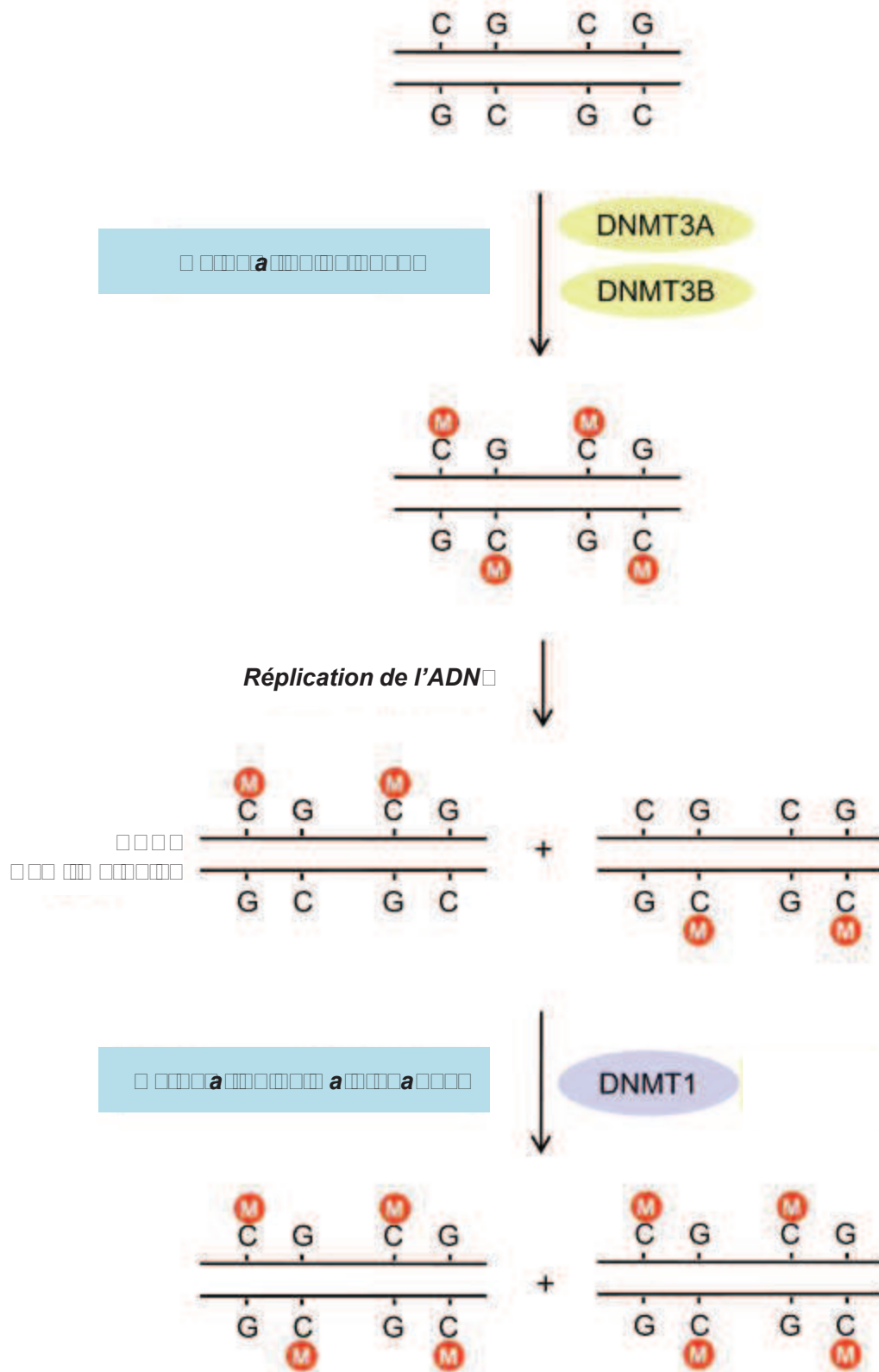


Figure I.53 : Méthylation *de novo* et de maintenance (Yu *et al.*, 2011).

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 I.54). De nombreux gènes suppresseurs de tumeur sont ainsi « éteints » au cours de la cancérogenèse bronchopulmonaire (Tableau I.7), tels que *P16^{INK4A}* ou le gène *O⁶-MethylGuanine-DNA MethylTransferase (MGMT)*. La protéine P16 inhibe la phosphorylation cycline D-dépendante de RB, empêchant ainsi la transition G₁-S ; une perte de l'activité de P16 conduit donc à une dérégulation de la prolifération cellulaire (Gazzeri *et al.*, 1998). La protéine O⁶-AlkylGuanine DNA alkylTransferase (AGT), codée par *MGMT*, est une enzyme de réparation de l'ADN assurant sa protection contre les agents alkylants (Shiraishi *et al.*, 2000).

3.4.1.2. Méthylation globale de l'ADN

En plus de ces modifications spécifiques au niveau des îlots CpG, l'ADN des cellules cancéreuses est globalement hypométhylé (Esteller, 2007). Cette hypométhylation a lieu au niveau de longues séquences répétitives, telles que les répétitions centromériques, les rétrotransposons ou l'ADN ribosomal (Sharma *et al.*, 2010).

Le niveau de méthylation du rétrotransposon *LINE-1* (Long Interspersed Nucleotide Element 1) est un bon indicateur du niveau de méthylation globale de l'ADN (Suzuki *et al.*, 2013). *LINE-1* est hypométhylé dans de nombreux cas de NSCLC (Anisowicz *et al.*, 2008; Daskalos *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2013) et serait un marqueur de mauvais pronostic (Saito *et al.*, 2010). L'hypométhylation de *LINE-1* et de *Alu*, un rétrotransposon de même type, est associée à une réactivation de ces éléments conduisant à une instabilité génétique, impliquée dans la cancérogenèse (Daskalos *et al.*, 2009).

La perte de méthylation de ces séquences répétitives pourrait être liée à une déplétion en DNMT3A, chargée de la protection des domaines actifs des chromosomes contre l'hypométhylation (Raddatz *et al.*, 2012).

3.4.1.3. Effets des PM_{2.5}

Différents agents chimiques contenus dans les PM_{2.5}, ou les PM_{2.5} elles-mêmes, sont capables de modifier la méthylation de l'ADN.

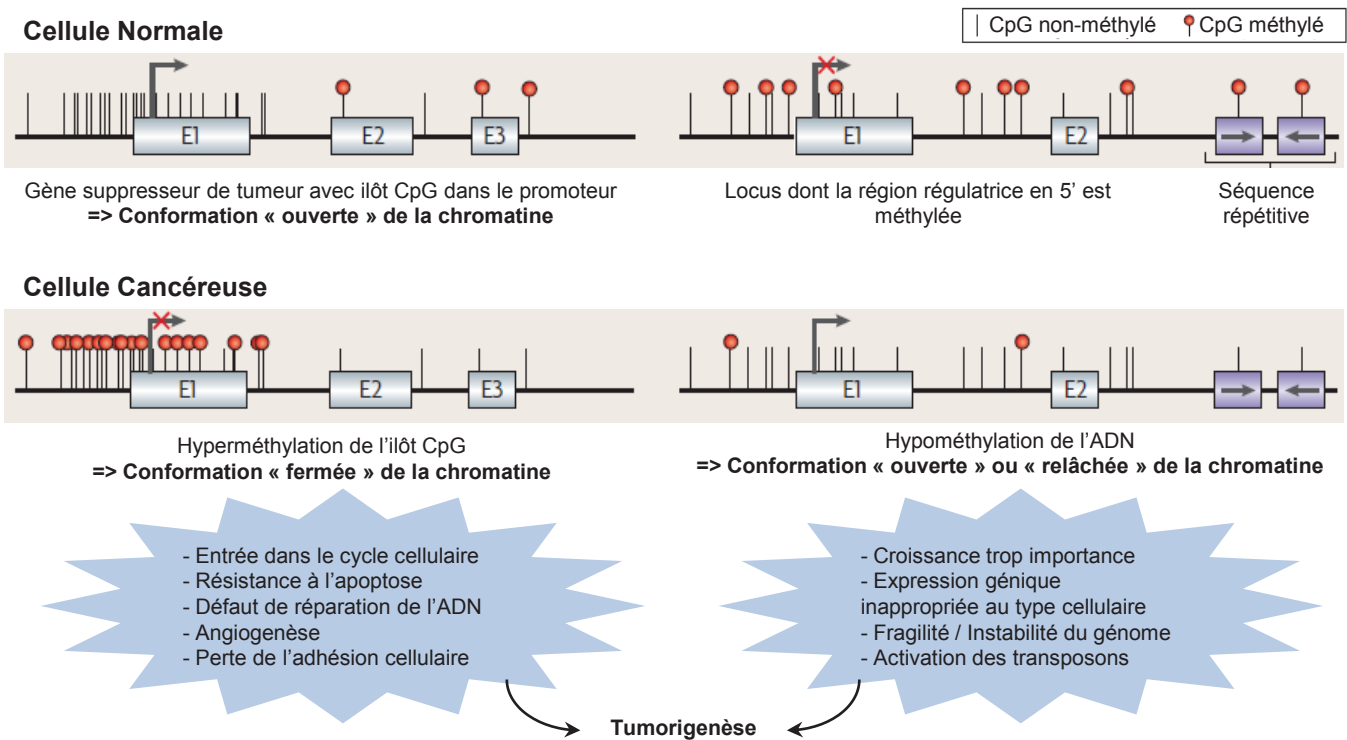


Figure I.54 : Différence de profil de méthylation entre les cellules normales et cancéreuses (adapté de Esteller, 2007).

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

Tableau I.7 : 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.

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 (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 épithéliales 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 du promoteur de *ER- α* et 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). De manière intéressante, Soberanes *et al.* ont mis en évidence une hyperméthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* après exposition de souris à des $PM_{2.5}$ d'origine urbaine (Soberanes *et al.*, 2012).

Des mesures du niveau de méthylation de l'ADN de leucocytes circulants ont été réalisées chez l'homme dans différentes conditions d'exposition spécifiques. Une hypométhylation simultanée de *LINE-1* et *Alu* a ainsi été démontrée après exposition à des PM_{10} riches en métaux ou à un faible niveau de benzène (Bollati *et al.*, 2007; Tarantini *et al.*, 2009). Une hypométhylation de *Alu* est également associée à l'exposition à différents POP, dont les PCB (Rusiecki *et al.*, 2008), alors que *LINE-1* est hypométhylé après exposition aux HAP ou à des $PM_{2.5}$ issues du trafic routier (Baccarelli *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2013). Les promoteurs de différents gènes sont quant à eux 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.*, 2011a). 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).

3.4.2. Modifications post-traductionnelles d'histones

Les histones sont les protéines permettant la structuration de la chromatine. Deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 sont associés en octamère afin de former le nucléosome autour duquel vient s'enrouler l'ADN « *core* » à deux reprises, soit 146 paires de bases (Luger *et al.*, 1997) (Figure I.55). Les nucléosomes sont séparés par une portion d'ADN dit « *linker* », associé à l'histone H1. Des nucléosomes émergent les queues des histones, susceptibles d'être la cible de différentes modifications post-traductionnelles (MPT).

3.4.2.1. Types de modifications

Les trois modifications les plus fréquentes des queues N-terminales des histones sont la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation, auxquelles viennent s'ajouter des événements plus rares d'ubiquitinylation, ADP-ribosylation, sumoylation ou encore biotinylation (Kanwal and Gupta, 2010). Différents résidus lysine, arginine, sérine ou thréonine peuvent être modifiés sur chacune des histones nucléosomiques (Figure I.56). Un type de modification est généralement associé à chaque résidu pour une position donnée, hormis la lysine 9 de l'histone 3 qui peut être soit méthylée, soit acétylée (Lacoste and Côté, 2003).

La phosphorylation des histones a lieu au niveau de sérines ou de thréonines (Sawicka and Seiser, 2012). La modification la plus fréquemment étudiée est la phosphorylation de la serine 139 du variant H2AX de l'histone H2A, induite par les cassures double-brin de l'ADN (Rogakou *et al.*, 1998). Il semble que cette modification conduise à la formation de larges domaines de chromatine favorisant la réparation (Rossetto *et al.*, 2012).

La phosphorylation des histones est également impliquée dans d'autres fonctions cellulaires essentielles, telles que la condensation de la chromatine au cours de la mitose associée à des phosphorylations de H3 au niveau des sérines 10 et 28, ainsi que sur les thréonines 3 et 11 (Sawicka and Seiser, 2012). L'état de phosphorylation des histones est déterminé par l'équilibre entre les activités histone kinase et histone phosphatase (Lohse *et al.*, 2011) (Figure I.57.A).

L'acétylation des histones a lieu sur des résidus lysine spécifiques et neutralise leur charge positive. Ceci conduit à une diminution des interactions des histones acétylées avec l'ADN nucléosomique, les nucléosomes voisins ou encore certaines protéines régulatrices, rendant l'ADN plus accessible. L'acétylation des lysines est donc une marque permissive et

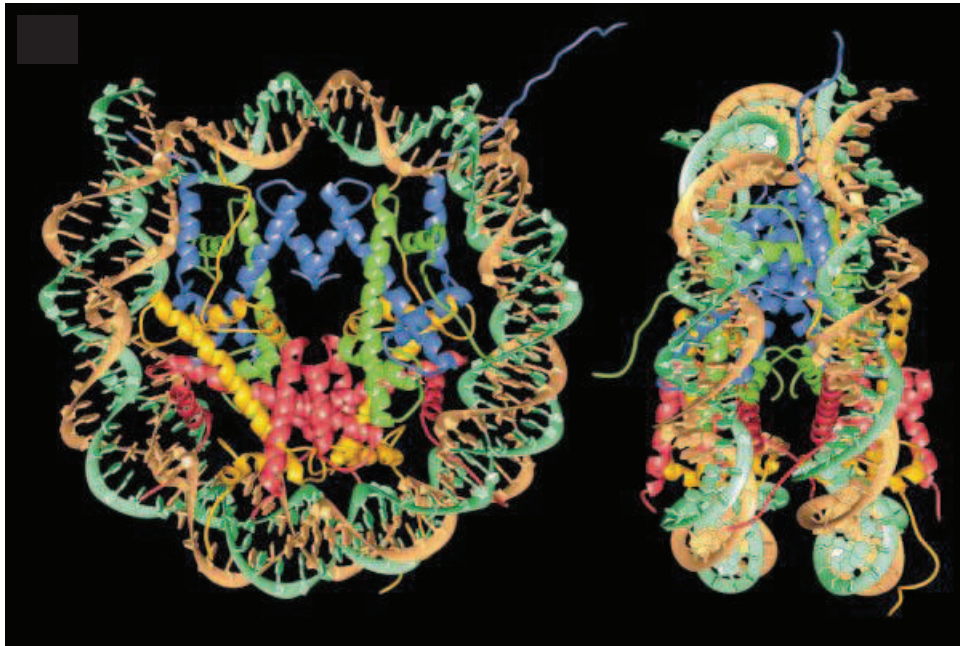


Figure I.55 : Structure du nucléosome, constitué de 2 histones H2A (en jaune), 2 histones H2B (en rouge), 2 histones 3 (en bleu) et 2 histones 4 (en vert) (Luger *et al.*, 1997).

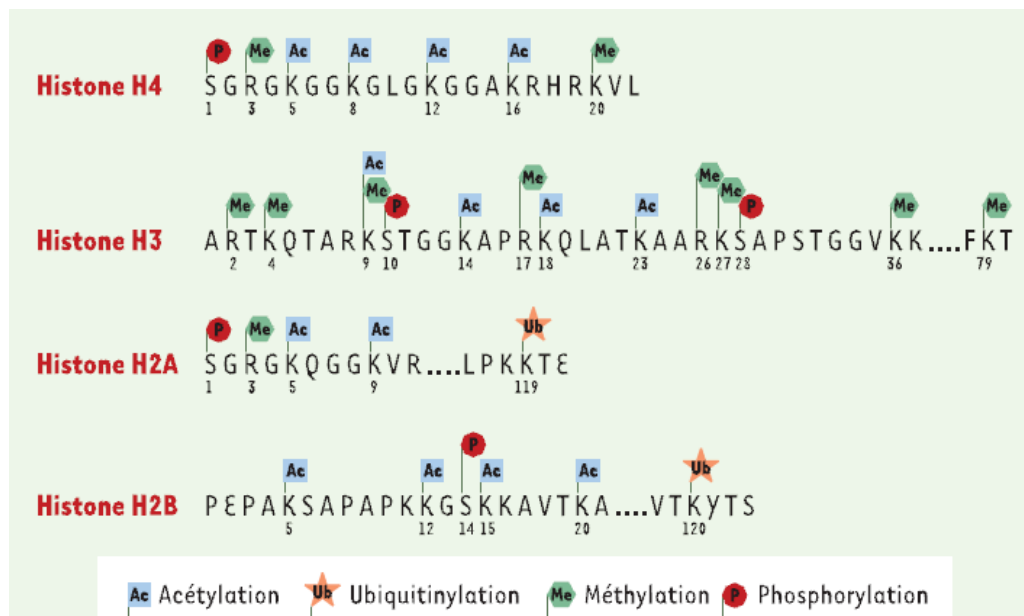


Figure I.56 : Principaux acides aminés des histones soumis aux modifications post-traductionnelles (Lacoste and Côté, 2003).

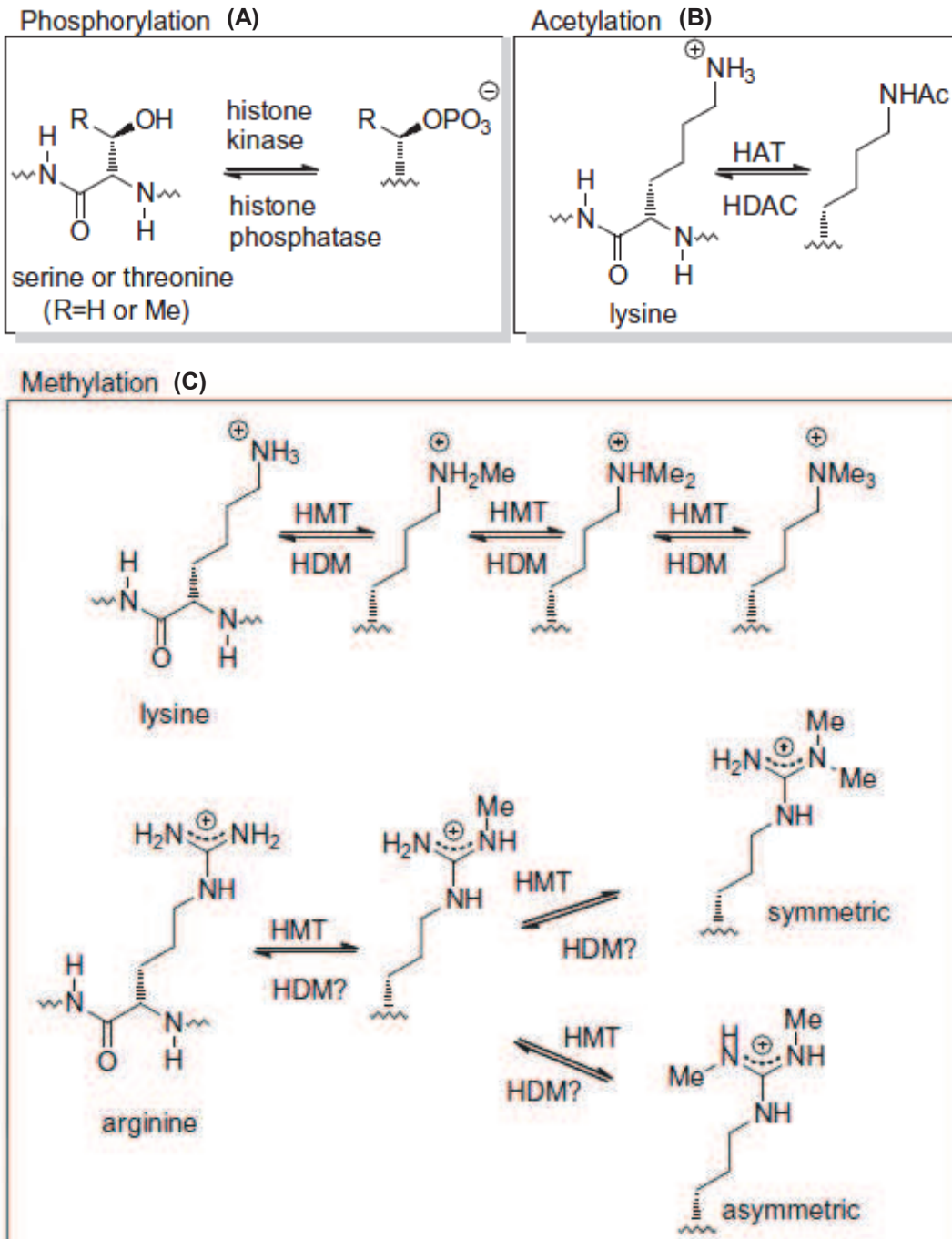


Figure I.57 : Modifications post-traductionnelles des histones : phosphorylation (A), acétylation (B) et méthylation (C) (Lohse *et al.*, 2011).

HAT : Histone AcétylTransférase ; HDAC : Histone DésAcétylase ; HDM : Histone DéMéthylase ; HMT : Histone MéthylTransférase

contribue à la délimitation entre euchromatine et hétérochromatine (Lacoste and Côté, 2003).

Le profil de cette marque épigénétique est régulé par l'équilibre entre les activités Histones AcétylTransférases (HAT) et Histones DésAcétylases (HDAC) (Peserico and Simone, 2011) (Figure I.57.B). Chez les mammifères, il existe différentes HAT et HDAC regroupées en classes (HDAC) ou sous-classes (HAT) selon leur homologie de séquence avec les HAT et HDAC chez la levure (Tableau I.8).

La méthylation des histones peut avoir lieu au niveau de résidus lysine ou arginine, principalement sur les extrémités N-ter des histones 3 et 4. Deux familles d'Histone MéthylTransférases (HMT) peuvent intervenir, selon l'acide aminé méthylé. Ainsi, les Protéine Arginine MéthylTransférases (PRMT, la lettre R étant le symbole de l'arginine) méthylient les résidus arginine, alors que les protéines à domaine SET (Su[*var*]3-9, Enhancer of zeste, Trithorax) méthylient les lysines. Il existe également des histones déméthylases (HDM), dont l'existence n'a été montrée que plus tardivement. Ces déméthylases peuvent appartenir à la famille des Lysine-Specific Demethylases (LSD 1 ou 2) ou au groupe des JmJC domain-containing Histone Demethylases (JHDM) (Hoffmann *et al.*, 2012) (Figure I.57.C).

Alors que la méthylation des arginines semble favoriser la transcription, la méthylation des lysines peut être associée à l'hétérochromatine, comme cela est le cas pour H3K9, autant qu'à l'euchromatine dans le cas de H3K4 (Lacoste and Côté, 2003). Un certain nombre de résidus lysine, tels que la lysine 4 de H3, ont également la particularité de pouvoir être mono- di- ou tri-méthylés, conduisant à des réponses différentes et augmentant d'autant l'étendue des combinaisons de MPT (Lennartsson and Ekwall, 2009).

3.4.2.2. Code histone

Comme nous venons de le voir, les histones sont susceptibles d'être la cible de nombreuses MPT. Une étude systématique des acétylations, méthylations, phosphorylations et ubiquitylations des histones nucléosomiques extraites de thymus de veau a ainsi mis en évidence 13 sites de modification sur l'histone 2A, 12 sur H2B, 21 sur l'histone 3 et 14 sites sur H4 (Zhang *et al.*, 2003a). A cette multiplicité des sites s'ajoute la possibilité de modifications multiples sur un même site, qu'il s'agisse de modifications différentes, et auquel cas exclusives, ou de la méthylation des lysines décrite précédemment.

L'ensemble de ces MPT peut avoir un effet direct sur la structure de la chromatine, en modifiant les interactions entre nucléosomes ou nucléosome-ADN, ou agir de manière

Fonction	Sous-classe (HAT) Classe (HDAC)	Membre	Altérée dans certains cancers	
Histone AcétylTransférase (HAT)	GNAT	GCN5L		
		pCAF	x	
		Tip60	x	
	MYST	Autres	HBOI	
			MORF	x
			MOZ	x
			CLOCK	
			NCOAT	
			MOF	
			p300/CBP complexe TFIIC ACTR/SRC-I ATF-2	dont CBP ¹
	Histone DésACétylase (HDAC)	I	HDAC1	dont CBP ²
			HDAC2	dont CBP ²
			HDAC3	x
HDAC8			dont CBP ²	
II		Autres	HADC4	dont CBP ²
			HDAC5	x
			HDAC7	x
			HDAC9	
			HDAC6	x
			HDAC10	dont CBP ²
III		Autres	SIRT1	x
			SIRT2	x
			SIRT3	x
			SIRT4	x
			SIRT5	
			SIRT6	
			SIRT7	x
IV	HDAC11	x		

Tableau I.8 : Histones acétyltransférases et histones désacétylases identifiées chez les mammifères (adapté de Kanwal and Gupta, 2010 ; Peserico and Simone, 2011).

¹ Karamouzis et al., 2007 ; ² Barneda-Zahonero and Parra, 2012 ; CBP : cancer broncho-pulmonaire.

indirecte en permettant le recrutement de facteurs modification-dépendants (Winter and Fischle, 2010).

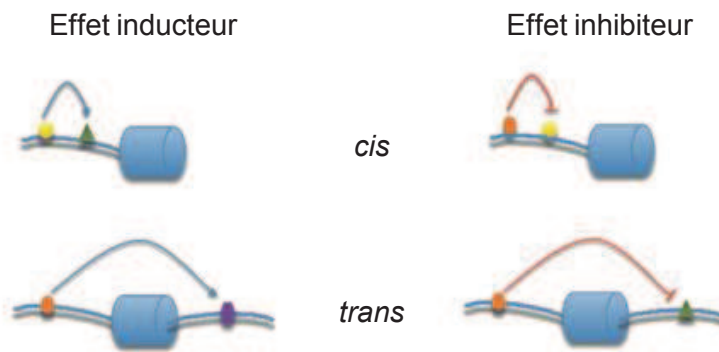
Néanmoins, de nombreuses études suggèrent que les modifications d'histones n'agissent pas de manière isolée mais exercent leur effet par l'association de différentes modifications en *cis*, c'est-à-dire sur une même histone, et en *trans*, avec les histones ou les nucléosomes adjacents, afin de former un « code histone » (Jenuwein and Allis, 2001; Lacoste and Côté, 2003; Lennartsson and Ekwall, 2009). Il a également été montré que les MPT des histones peuvent agir de manière positive ou négative les unes sur les autres, par un effet inducteur / inhibiteur direct ou par l'intermédiaire d'autres protéines. Au final, la présence d'une combinaison de modifications sur une portion de chromatine donnée semble constituer une « empreinte » déterminant le statut actif ou inactif de la chromatine (Jenuwein and Allis, 2001) (Figure 1.58).

3.4.2.3. Effets des PM_{2.5}

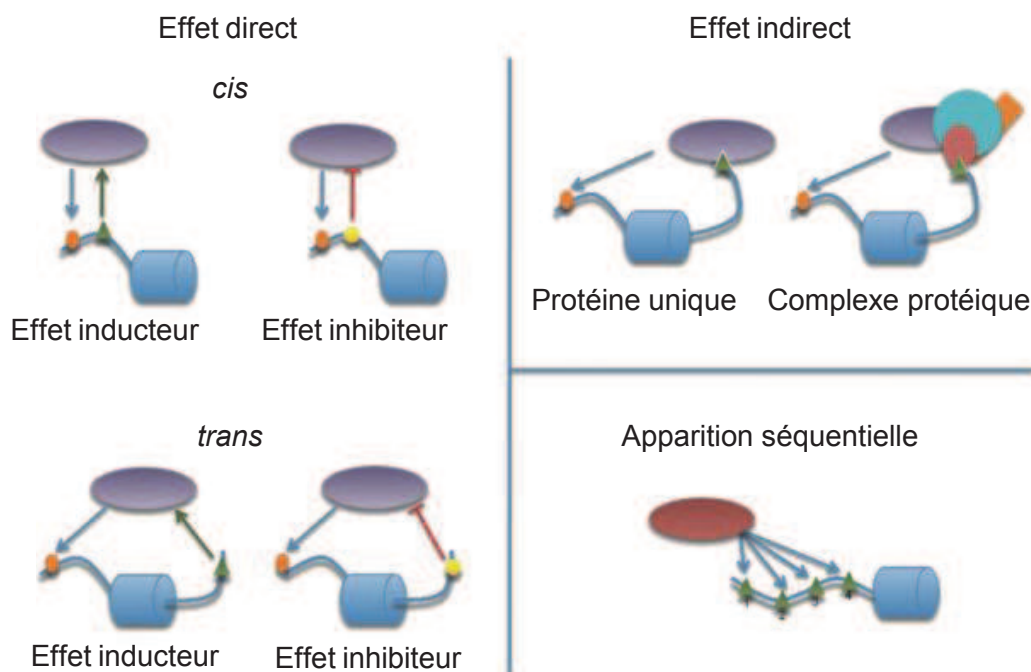
Différents contaminants environnementaux sont susceptibles d'altérer les MPT d'histones ainsi que les activités enzymatiques associées à ces modifications.

Les effets du nickel, de l'arsenic et du chrome ont particulièrement été étudiés. L'exposition de cellules A549 à du nickel (NiCl₂) conduit ainsi à une hypoacétylation des quatre histones nucléosomiques, à une augmentation de la mono- et la di-méthylation de H3K9 et à une hyper-ubiquitinylation de H2A et H2B (Chen *et al.*, 2006; Ke *et al.*, 2006). De même, l'exposition des mêmes cellules à du nickel (Ni₃S₂), conduit à une hypoacétylation de H4, et en particulier de H4K12 (Broday *et al.*, 2000). Le nickel semble également induire une augmentation de la diméthylation de H3K9 et de la triméthylation de H3K4 (Zhou *et al.*, 2009). Il a enfin été montré que le nickel perturbait l'ubiquitinylation des histones H2A et H2B et diminuait l'acétylation des histones nucléosomiques, et en particulier de H2B, dans des cellules pulmonaires en culture (Golebiowski and Kasprzak, 2005; Karaczyn *et al.*, 2006). Le chrome semble quant à lui induire une augmentation de la diméthylation de H3K9 et de la triméthylation de H3K4 dans les cellules A549 (Zhou *et al.*, 2009), ainsi qu'une réduction de l'acétylation des histones 3 et 4 (Wang *et al.*, 2012). Deux études ont également été réalisées sur l'arsenic dans les cellules A549, mettant en évidence une augmentation de la diméthylation de H3K9 et de la triméthylation de H3K4, ainsi qu'une diminution de la triméthylation de H3K27 (Zhou *et al.*, 2008, 2009). Des résultats inconstants concernant les effets de l'arsenic sur l'acétylation de H3K18 ont également été décrits dans l'étude d'une population exposée (Chervona *et al.*, 2012).

Interaction directe entre les modifications



Interaction avec une autre protéine



Interactions pour la « lecture » du code

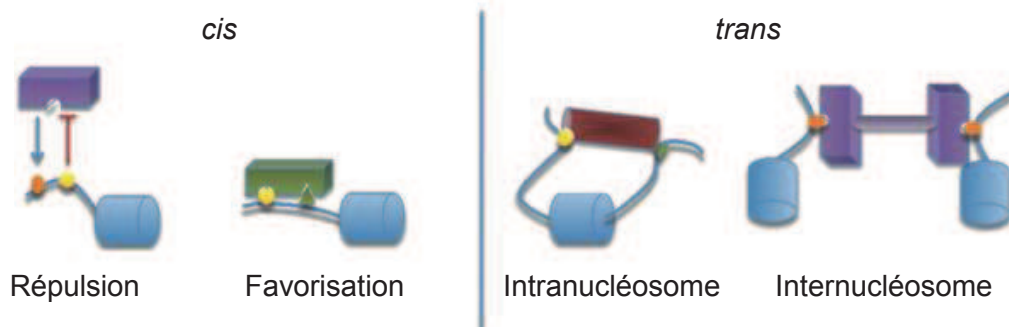


Figure I.58 : Interactions entre les modifications post-traductionnelles d'histones (d'après Winter and Fischle, 2010).

Les métaux ne sont pas les seuls composés à induire des modifications d'histones. En effet, une étude a mis en évidence différentes modifications épigénétiques après exposition au B[a]P et liées à l'activation de l'Ahr, à savoir une augmentation de la phosphorylation de H3S10, de H3K4me3, de H3K14ac et de H3K16ac, ainsi qu'une diminution de H3K4me2 (Schnekenburger *et al.*, 2007).

Enfin, et d'un point de vue plus global, il semble que les PM₁₀ augmentent l'activité HAT ainsi que le niveau d'acétylation de l'histone 4 dans les cellules exposées (Donaldson *et al.*, 2003). Il a également été montré que le niveau de H3K4me2 était augmenté dans les leucocytes de travailleurs en aciérie, exposés à des particules riches en métaux (Cantone *et al.*, 2011).

3.4.3. miRNA

Les miRNA sont de courts ARN non-codants endogènes, capables de réguler l'expression de gènes de manière post-transcriptionnelle (Malleter *et al.*, 2012). La forme mature des miRNA a une longueur de l'ordre de la vingtaine de nucléotides, la gamme de taille pouvant être de 19-22, 21-23, ou 19-30 selon les auteurs (Ji *et al.*, 2012; Kanwal and Gupta, 2010; Lu *et al.*, 2012). Ces miRNA intervenant dans la régulation de processus cellulaires clés, tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose, leur altération pourrait avoir des conséquences importantes sur la tumorigenèse (Kumar *et al.*, 2007).

3.4.3.1. Formation

La formation des miRNA matures nécessite différentes étapes (Figure I.59). La première d'entre elle est la transcription du gène codant pour le miRNA.

La plupart des gènes codant les miRNA sont localisés dans des régions non-codantes de l'ADN, le plus souvent isolément mais parfois associés en « *clusters* », et possèdent leur propre système de transcription. Néanmoins, un quart des gènes codant pour des miRNA seraient localisés dans des séquences introniques de gènes et orientés dans le même sens. Ils sont en règle générale traités à partir des introns lors de la transcription du gène en ARNm, mais certains, tels que miR-21, possèdent leur propre système de transcription et sont donc exprimés indépendamment du gène qui les contient (Bartel, 2004; Gregory and Shiekhattar, 2005; Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

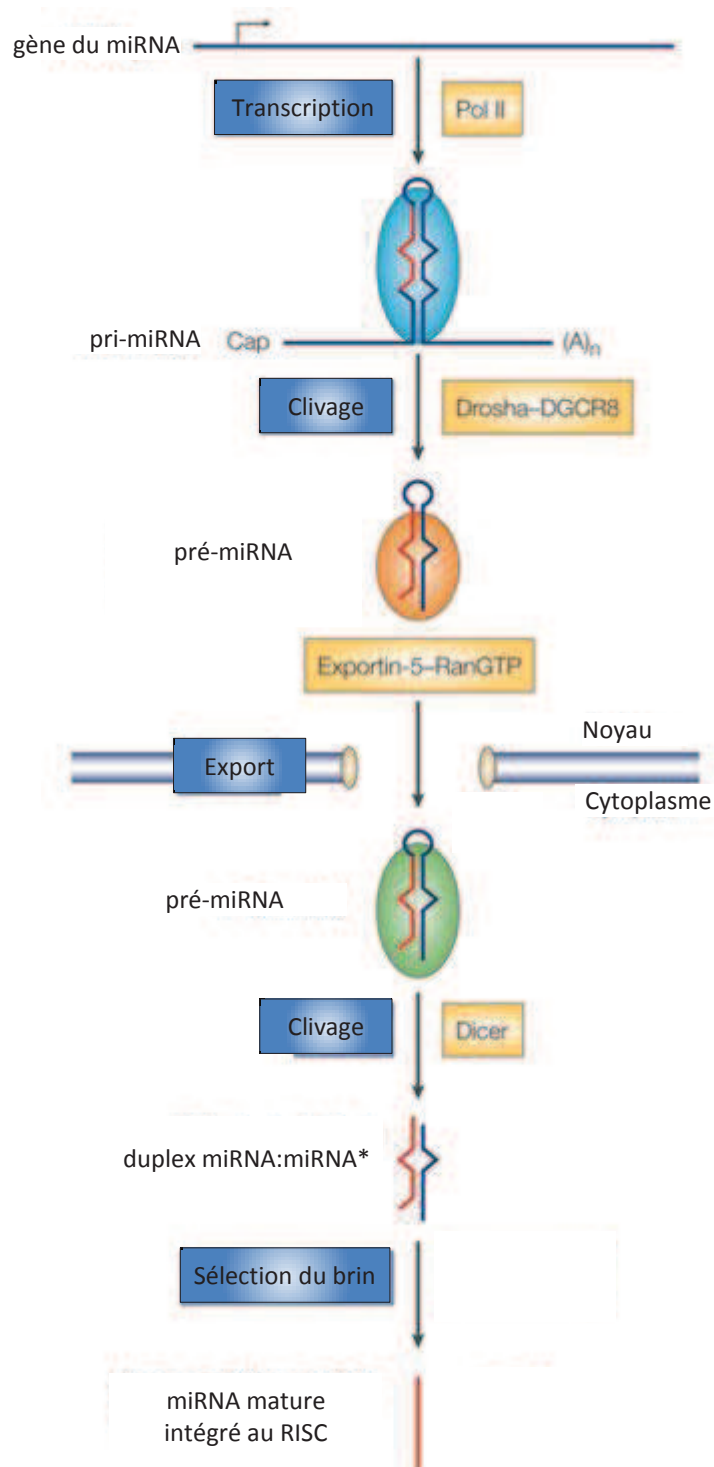


Figure I.59 : Mécanisme de formation des miRNA (adapté de Kim, 2005).

Les miRNA sont initialement transcrits par l'ARN polymérase II (Lee *et al.*, 2004), sous la forme d'un primary-miRNA (pri-miRNA) possédant une coiffe 7-méthylguanosine en 5' et une queue polyA en 3' (Cai *et al.*, 2004) et présentant une forme en « épingle à cheveux » (Gregory and Shiekhattar, 2005).

Les pri-miRNA sont pris en charge par le « *microprocessor complex* », constitué de l'enzyme Drosha, une ribonucléase de type III, associée à la protéine DGCR8 et qui clive le pri-miRNA de manière à former un pré-miRNA de 60 à 100 nucléotide possédant une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3' libre de 2 nucléotides (Gregory *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003).

Le pré-miRNA est ensuite exporté du noyau par le système Exportin-5/RanGTP (Bohnsack *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003) où il est pris en charge par l'enzyme DICER, une autre ribonucléase de type III, qui clive le pré-miRNA en libérant un duplex miRNA:miRNA*. L'un des brins de ce duplexe, miRNA, constitue le miRNA mature, alors que l'autre, appelé miRNA*, est un fragment de taille similaire issu du bras opposé du pré-miRNA (Bartel, 2004).

3.4.3.2. Mode d'action

Les miRNA exercent leur activité régulatrice au sein du RNA-induced silencing complex (RISC). L'assemblage de ce complexe dépend des protéines DICER-2, Argonaute2 (Ago2), Trans-activation response RNA-Binding Protein (TRBP) et Protein Activator of PKR (PACT), regroupées pour former le RISC-Loading Complex (RLC) (Lee *et al.*, 2006; MacRae *et al.*, 2008).

Le modèle de formation en plusieurs étapes présenté ci-dessus aboutit à la formation d'un duplex miRNA:miRNA*, qui est incorporé dans le RISC, provoquant la dégradation du miRNA* (Bartel, 2004). Les mécanismes de sélection du miRNA au détriment du miRNA* sont encore débattus, mais certains auteurs ont suggéré qu'elle pourrait être déterminée par l'abondance de la cible du miRNA (Kang *et al.*, 2013), alors que d'autres ont souligné l'importance de la présence des protéines du RLC (Noland and Doudna, 2013).

Quel que soit le mécanisme de sélection, le miRNA permet le ciblage de l'ARNm à inhiber par complémentarité de séquence, l'inhibition par le RISC étant ensuite obtenue par clivage ou répression traductionnelle (Lee *et al.*, 2006). Le choix de l'un ou l'autre de ces mécanismes dépend du niveau de complémentarité entre les séquences du miRNA et de l'ARNm. Une complémentarité forte conduit ainsi au clivage de l'ARNm au niveau de l'appariement avec les nucléotides 10 et 11 du miRNA, ce dernier restant intact. A l'inverse,

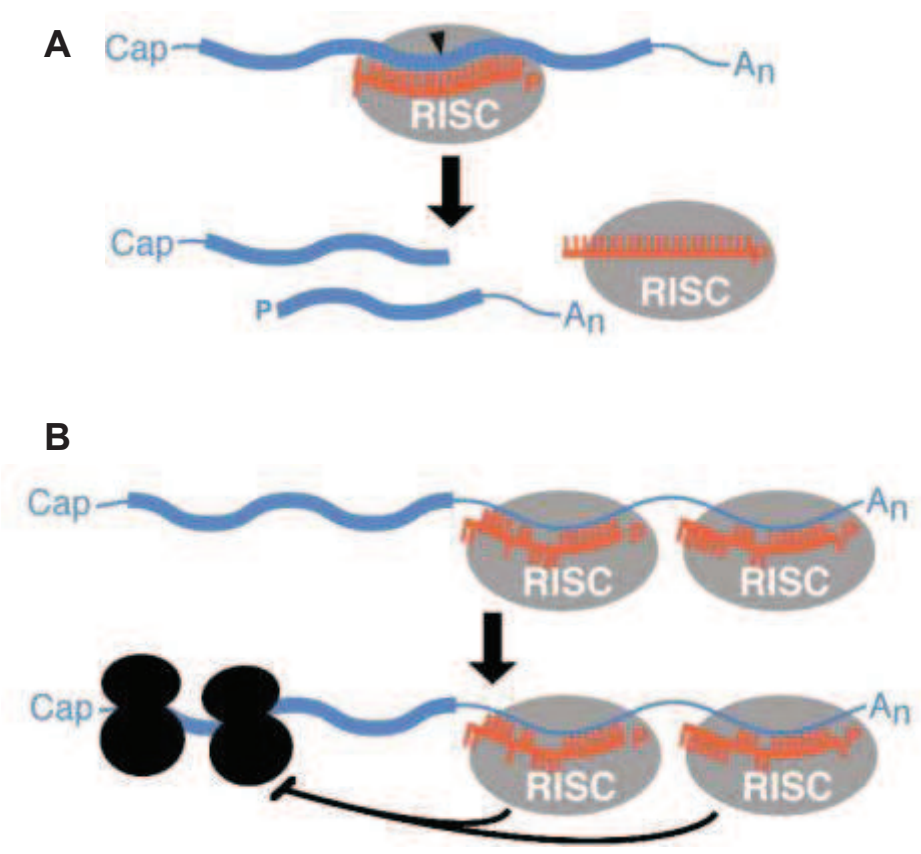


Figure 1.60 : Mode d'action des miRNA, par clivage (A) ou par répression traductionnelle de l'ARNm (B) (Bartel *et al.*, 2004).

une complémentarité plus faible, mais néanmoins présente au niveau d'un certain nombre de sites, provoque la répression traductionnelle de l'ARNm (Bartel, 2004) (Figure I.60). Cette répression a lieu par l'action conjointe de plusieurs RISC qui se fixent au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm, bloquant la traduction et conduisant à la formation de corps-P (*P-body*) permettant la dégradation des ARNm (Rossi, 2005).

Etant donné la reconnaissance de l'ARNm cible par complémentarité de séquence, il devient possible de prédire les cibles des miRNA. Différentes bases de données ont ainsi été mises en place telles que miRBase (Griffiths-Jones *et al.*, 2006), qui répertorie les séquences publiées de miRNA, miRTarBase (Hsu *et al.*, 2011), qui dresse la liste des cibles validées pour chaque miRNA, ou encore TarBase (Vergoulis *et al.*, 2011), qui ajoute aux cibles validées les prédictions basées sur la probabilité d'interaction entre un miRNA avec ses gènes cibles. Les effets combinés de différents miRNA peuvent également être évalués grâce à des bases telles que miRPath (Vlachos *et al.*, 2012).

3.4.3.3. Effets des PM_{2.5}

Nous nous appuierons 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 (plus de 24 000 référencés dans miRBase en juin 2013) 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 (DEP, Diesel Exhaust Particles) 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 et que nous étudierons au cours de ce travail. 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 étudié l'expression de trois miRNA (miR-222, miR-21 et miR-146a) dans des leucocytes avant et après une

exposition professionnelle à des PM₁₀ riches en métaux (Bollati *et al.*, 2010). Deux des trois miRNA ont vu leur expression significativement augmentée après exposition, dont miR-21, un miRNA associé à la réponse au stress oxydant surexprimé dans de nombreux cancers (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.

3.4.4. Interactions entre les mécanismes épigénétiques

Les trois mécanismes épigénétiques ont été décrits de manière individuelle dans les paragraphes précédant. Néanmoins, 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 I.61). 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 MPT 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).

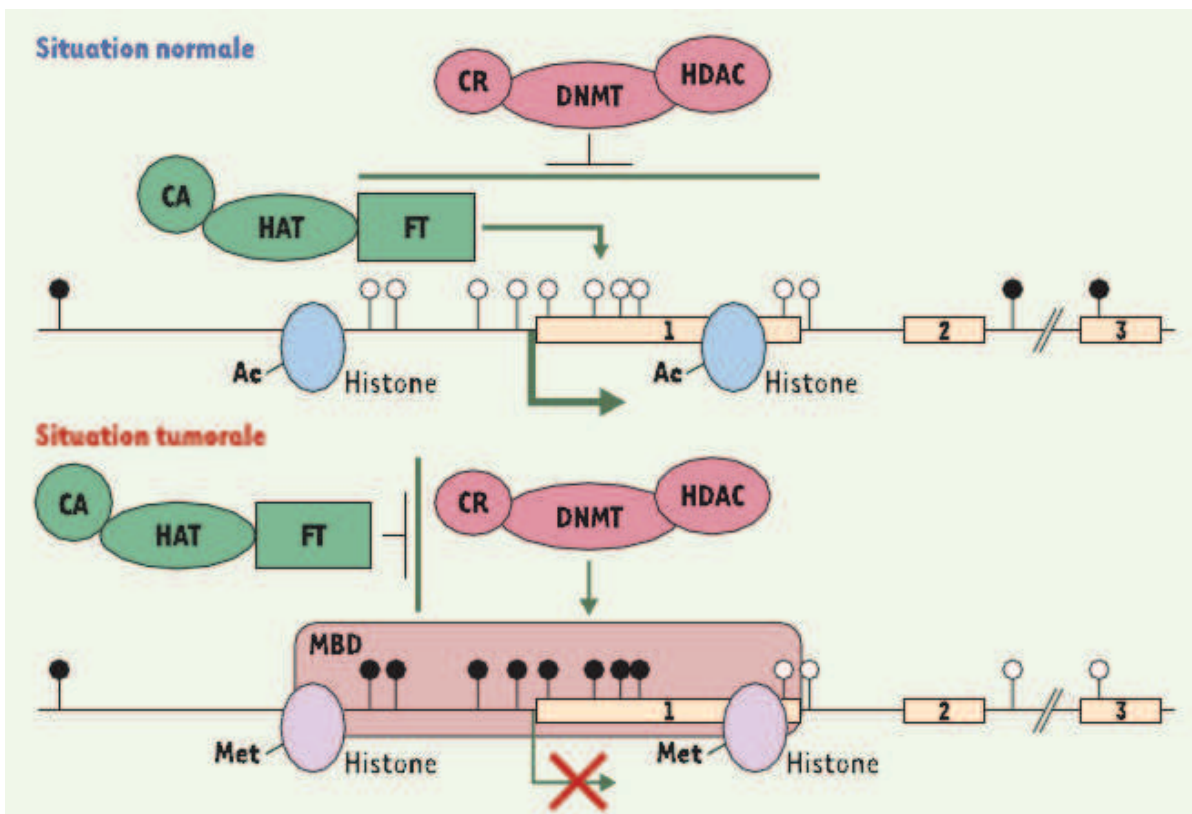


Figure I.6 : Coopération entre les mécanismes épigénétiques dans la régulation de la compaction de la chromatine (Deltour et al., 2005).

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

La pollution de l'atmosphère est un problème mondial, qui serait la cause de 800 000 décès annuels (OMS, 2002, 2009). Parmi les polluants de l'air extérieur, les particules représentent un problème toxicologique complexe, car elles présentent des caractéristiques physiques et une composition chimique variables, dépendant de leur mode de formation et de leurs sources d'émission. L'appareil respiratoire représente la plus grande surface d'échange de l'organisme avec l'air extérieur et constitue donc la cible privilégiée de ces particules atmosphériques. De nombreuses études épidémiologiques ont ainsi mis en évidence une association entre une augmentation de la pollution atmosphérique particulaire et un accroissement de la mortalité et de la morbidité par maladies cardio-respiratoires.

La taille des particules est un paramètre fondamental dans l'évaluation du risque représenté par l'exposition à la pollution particulaire, car elle conditionne la pénétration et la déposition des particules le long de l'arbre respiratoire. Ainsi, les particules fines, dont le diamètre est inférieur à 2,5 µm, sont capables de pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires où elles peuvent être retenues. Cependant, la taille des particules n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. Il apparaît en effet évident, d'après les nombreuses études *in vitro* et *in vivo* publiées, que toutes les particules n'ont pas la même toxicité et que la dose seule ne peut suffire à expliquer les effets délétères qu'elles engendrent. L'association entre les caractéristiques physico-chimiques et la toxicité des particules atmosphériques reste néanmoins difficile à appréhender, car les effets toxiques observés se révèlent bien souvent différents de la somme des effets prévisibles pour chacun des polluants considéré isolément aux concentrations retrouvées. Ceci suggère, selon les cas, l'existence de phénomènes d'additivité, de synergie ou d'antagonisme entre les différentes substances présentes.

Considérant la classification récente des particules diesel, faisant partie intégrantes des aérosols atmosphériques, comme cancérogène certain pour l'Homme (Groupe 1) par le Centre International de Recherches sur le Cancer, la question du potentiel cancérogène des particules atmosphériques dans leur ensemble devient un enjeu majeur de santé publique. Cet enjeu est particulièrement important au niveau des « points noirs environnementaux » tels que l'agglomération Dunkerquoise. Celle-ci regroupe 250 000 habitants, sur un territoire caractérisé par la présence d'un complexe industriel lourd regroupant des activités de sidérurgie, métallurgie, chimie et pétrochimie, d'un centre de valorisation énergétique en périphérie de la zone urbaine, de deux axes autoroutiers très fréquentés et du troisième port industriel de France. Cette industrialisation massive, bien que représentant la première source d'emploi de la zone, fait de l'agglomération de Dunkerque le plus grand émetteur de particules de la région Nord - Pas de Calais. L'existence des différents sites et activités industrielles conditionne fortement la composition chimique des particules et pourrait donc avoir un effet majeur sur leur toxicité.

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

1. Quelle est la capacité d'échantillons de $PM_{2.5}$ collectés *in situ* à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancerogenèse, et l'influence de la composition chimique des particules sur les effets observés.

La réponse à ces deux questions est bien évidemment extrêmement complexe, mais nous nous sommes fixé pour objectif d'apporter des éléments de réponse en étudiant *in vitro* :

- la capacité d'échantillons de $PM_{2.5}$ collectés *in situ* à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancerogenèse,
- l'influence de la composition chimique des particules sur les effets observés.

Pour ce faire, nous avons utilisé six prélèvements de $PM_{2.5}$, réalisés à Dunkerque sous influence industrielle ou urbaine, ainsi qu'à Rubrouck, un village situé à 30 km au sud de l'agglomération, en tant que témoin rural. La collecte des $PM_{2.5}$ a été effectuée sur chacun des trois sites au cours de deux campagnes (printemps-été 2008 et automne-hiver 2008-2009), permettant l'intégration des variations saisonnières. Nous avons bénéficié d'une caractérisation physico-chimique détaillée des six échantillons de particules réalisée en amont de ce travail (Figure I.62).

Avant de mener notre étude toxicologique, nous avons souhaité compléter la caractérisation des particules par l'analyse de leur fraction biologique ainsi que de leur potentiel mutagène intrinsèque, par la réalisation de tests d'Ames sur trois souches de sensibilité différente.

Forts de cette connaissance approfondie de nos échantillons, nous avons recherché *in vitro* la capacité des échantillons de $PM_{2.5}$ à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancerogenèse. Nous avons choisi pour modèle la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaine d'origine normale BEAS-2B et avons déterminé les concentrations utilisées pour la suite de l'étude grâce à différents tests de cytotoxicité.

Sachant que près de 75 % des molécules cancérigènes seraient en réalité des pro-cancérigènes transformés par l'organisme en agents génotoxiques, nous avons au préalable évalué le potentiel de métabolisation des cellules BEAS-2B, et sa modulation par l'exposition aux échantillons de $PM_{2.5}$.

Pour atteindre notre objectif, nous nous sommes intéressés à différents mécanismes potentiellement impliqués dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancerogenèse que sont la génotoxicité, à la fois directe et indirecte, et les modifications épigénétiques. Ces différents aspects ont été évalués grâce à un panel de tests complémentaires. Les lésions

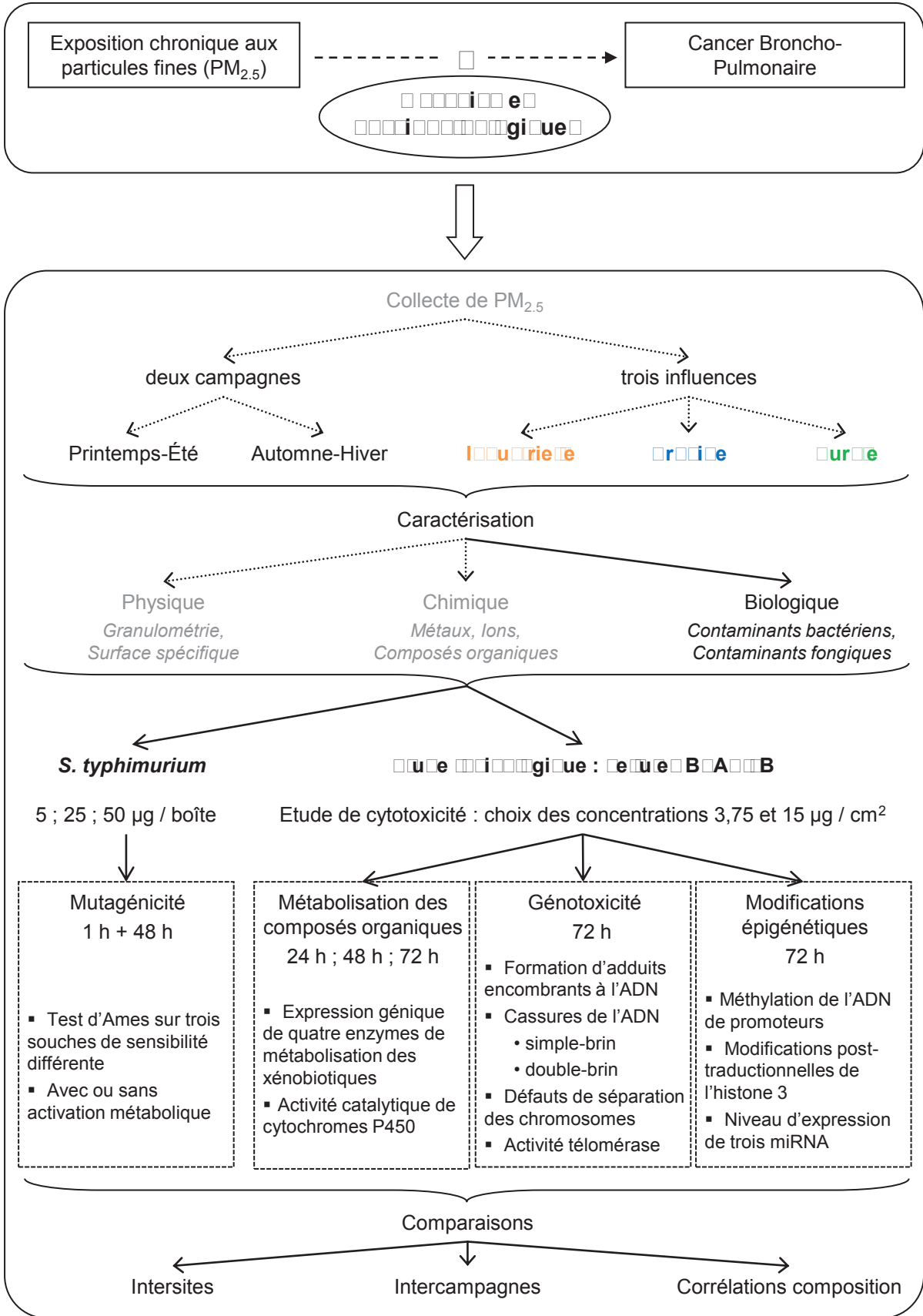


Figure I.6 : Protocole expérimental

primaires de l'ADN ont été évaluées par un dosage des adduits encombrants à l'ADN, par post-marquage au ^{32}P , et des cassures de l'ADN, grâce au test des comètes et à un dosage du taux de $\gamma\text{-H2AX}$ en cytométrie en flux. A l'interface entre génotoxicité directe et indirecte, nous avons quantifié la formation de micronoyaux, conséquence de l'exposition à des composés clastogènes ou aneugènes. 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 ensuite intéressés aux modifications épigénétiques éventuellement induites par les $\text{PM}_{2.5}$, approche nouvelle en toxicologie environnementale. Sur la base de marqueurs épigénétiques décrits dans les cancers broncho-pulmonaires, nous avons étudié l'état de méthylation des promoteurs de deux gènes suppresseurs de tumeur par PCR méthylation-spécifique, deux modifications post-traductionnelles d'histones par *Western-Blot* et le niveau d'expression de trois miRNA par RT-qPCR.

Tout au long de notre étude, nous avons associé les dosages biologiques à différentes méthodes statistiques afin de relier les effets observés à la composition des $\text{PM}_{2.5}$. Nous avons ainsi procédé à des comparaisons intersites et intercampagnes systématiques, combinées à des études de corrélations.

La méthodologie employée devrait nous permettre d'obtenir une caractérisation détaillée du potentiel mutagène et cancérigène *in vitro* d'échantillons réels de $\text{PM}_{2.5}$, de soulever différentes hypothèses mécanistiques et d'associer la composition chimique aux effets observés.

MATERIELS ET METHODES

1. REACTIFS

Les réactifs ont été obtenus chez les fournisseurs suivants :

- AbCam (Cambridge, Royaume-Uni)
 - o IgG polyclonale de lapin anti-H3K18ac
 - o IgG monoclonale de lapin anti-H3K4me2
 - o IgG polyclonale anti-histone 3 (C-ter)
- Acros Organics (Noisy le Grand, France) :
 - o Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique (EDTA)
 - o Dioxyde de titane (IV) (TiO₂), anatase, pureté = 99 %, taille des particules primaires = 0,2 µm, surface spécifique = 14 m² / g, surface non-coatée.
 - o Méthanol (*HPLC-grade*)
 - o Tris-HCl
- Active Motif (Rixensart, Belgique) : H3 recombinante non-modifiée (> 98 %)
- Calbiochem (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) : PhosphoDiesterase de Rate de veau (SPD)
- Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, France) :
 - o Chlorure de sodium (NaCl)
 - o Ethanol absolu (*RPE-grade*)
 - o Hydroxyde de sodium anhydre (NaOH)
- Cell Signaling Technology (Saint Quentin en Yvelines, France) :
 - o *Biotinylated Protein Ladder* (marqueur + anticorps)
 - o *Cell Lysis Buffer*
 - o IgG anti-lapin couplée HorseRadish Peroxidase (HRP)
- Fermentas (St Rémy les Chevreuses, France) : T4 PolyNucléotide Kinase (PNK)
- GE Healthcare Europe GmbH (Orsay, France) :
 - o Acrylamide 40 %
 - o Ammonium persulfate 10 %
 - o Bis-acrylamide 2 %
 - o Glycine
 - o Hybond[®] membrane PolyVinylidène DiFluoride (PVDF)
 - o N,N,N',N'-TEtraMéthylEthylèneDiamine (TEMED)
 - o SodiumDodécylSulfate (SDS)
 - o Tris-base
 - o Tween-20
- Life Technologies (Cergy Pontoise, France) :
 - o Amphotéricine B (fongizone)
 - o *FxCycle Violet Stain*
 - o *Mouse IgG1 - Alexa 488*
 - o *Novex[®] Sharp Protein Standard*
 - o *Power SybR Green*
 - o Tampon phosphate 10X (PBS)
 - o *TaqMan[®] Gene Expression Assays*

- Trypsine (0,5 % EDTA)
- Lonza (Bâle, Suisse) : Bronchial Epithelial cells Growth Medium (BEGM)
- Oxoïd SAS (Dardilly, France) :
 - Gélose Sabouraud
 - Gélose au sang frais
 - *Nutrient broth N°2*
- Perkin-Elmer Life Sciences (Courtaboeuf, France) : ³²P-γATP
- Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France) :
 - Acide acétique glacial
 - Agarose
 - Agarose *Low Melting Point*
 - Azide de sodium (NaN₃)
 - Benzo[a]Pyrène
 - Biotine
 - Bromure d'ETHidium (BET)
 - Butyrate de sodium
 - DiMéthylSulfOxyde (DMSO) (≥ 99,9 %)
 - Ethoxy-résorufine
 - Eukitt® *mounting medium*
 - Formaldéhyde 37 %
 - Giemsa *stain solution*
 - Glucose
 - Glucose-6-phosphate
 - Histidine
 - Mitomycine C
 - Nucléase micrococcale
 - Nucléase P1 (NP1)
 - PhénylMéthylSulfonyl Fluoride (PMSF)
 - PolyVinylPyrrolidone (PVP)
 - Résorufine
 - Sodium Lauryl Sarcosinate
 - Triton X-100
- Takara Bio Europe / SAS (Saint-Germain-en-Laye, France) : Taq polymérase
- Trinova Biochem (Giessen, Allemagne) : fraction S9 de microsomes hépatiques de rats induits par l'Aroclor-1254 (S9).

2. ECHANTILLONS DE PM_{2.5}

Nous avons réalisé notre étude sur six échantillons réels de PM_{2.5}, collectés et caractérisés dans le cadre de l'Appel à Projet de Recherche AFSSET 2007. L'équipe du Centre Commun de Mesures de l'ULCO, dirigée par le Dr Fabrice CAZIER, a procédé à la collecte des échantillons de PM_{2.5} et au dosage des COV, HAP, ions, métaux et métalloïdes. La société MicroPolluants Technologie SA a réalisé le dosage des composés chlorés (PCDD/F et PCB). Les analyses en microscopie électronique à balayage ont été réalisées par le Pr Dominique COURCOT, membre de l'UCEIV.



Les méthodes utilisées et les résultats obtenus sont résumés ci-dessous. Les résultats détaillés peuvent être retrouvés dans la publication de Cazier *et al.* (Cazier *et al.*, 2011).

2.1. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés sur deux sites distincts. Le premier est situé au niveau de la zone portuaire de Dunkerque (51,0350° N ; 2,3659° E) et permet, grâce à un asservissement selon la direction des vents, un échantillonnage sous influence urbaine (secteur : 60° à 225°) ou industrielle (secteur : 240° à 325°) (Figure II.1). Le second site, où ont été réalisés les prélèvements du bruit de fond rural, est situé à Rubrouck (50,8392° N ; 2,3542° E), soit 30 km au sud de Dunkerque et à l'intérieur des terres. Le site industriel le plus proche de ce site de prélèvement est une verrerie localisée à 15 km au sud, alors que Saint-Omer, ville la plus proche d'environ 15 000 habitants, se situe 15 km au sud-ouest.

Les échantillons de PM_{2.5} ont été collectés sous chacune des trois influences au cours des saisons printemps-été 2008 et automne-hiver 2008-2009. La collecte des PM_{2.5} a été effectuée à l'aide d'impacteurs en cascade à 5 étages de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna, USA) et d'une pompe aspirante grand volume (80 m³ / h) modèle TFIA (Staplex, New York, USA). Le recueil régulier des particules a été effectué par grattage des surfaces d'impaction. Pour chaque site et chaque campagne, les prélèvements ont été regroupés, pesés et homogénéisés par agitation. Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les masses de PM_{2.5} collectées ont été rapportées aux volumes d'air

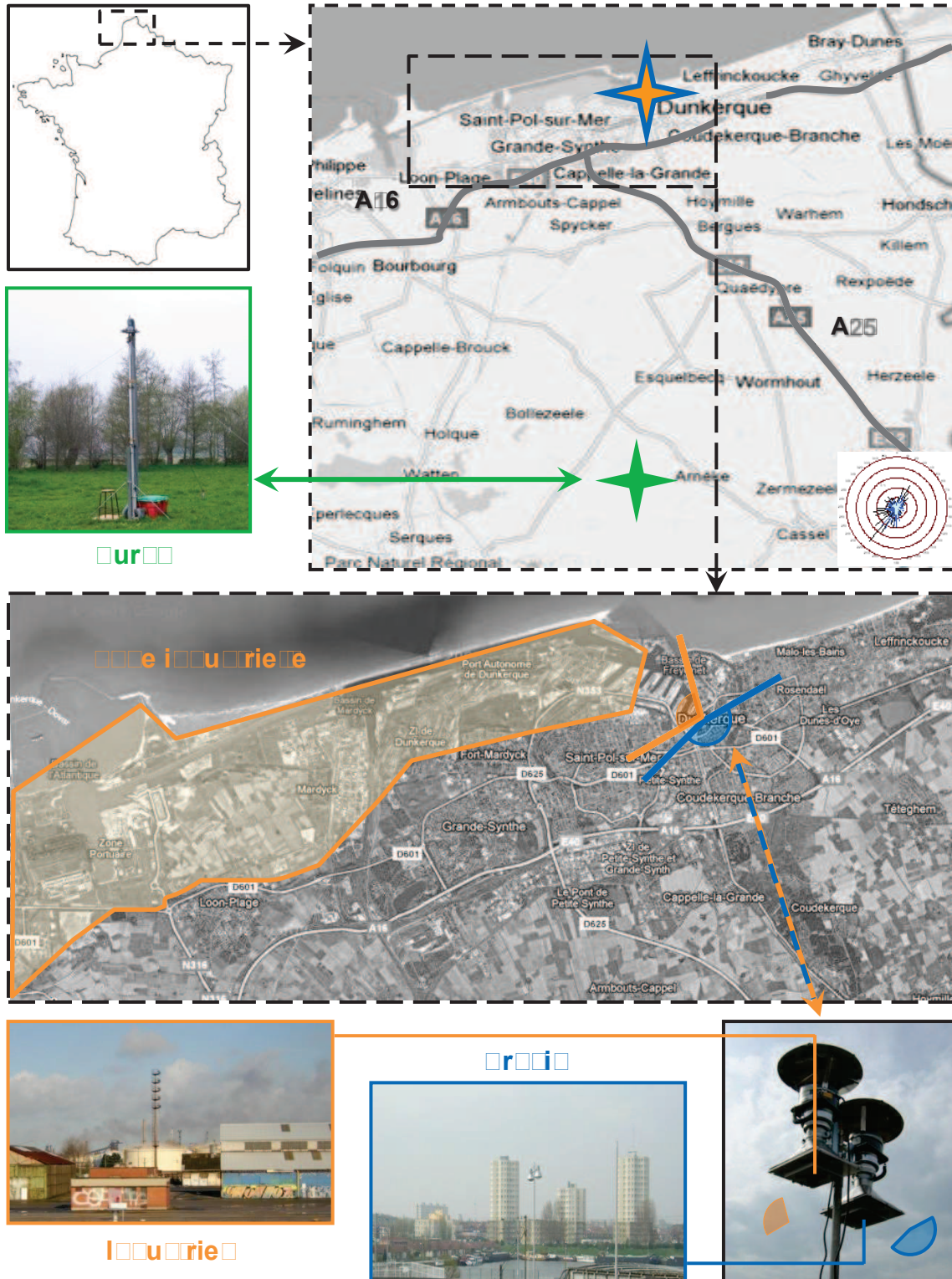


Figure II.1: Localisation des sites de prélèvement (Carte GoogleMaps).

prélevés, afin d'évaluer les rapports de concentration atmosphérique en $PM_{2.5}$ entre les différents sites au cours des saisons de prélèvement.

2.2. Caractérisation physico-chimique des $PM_{2.5}$

La distribution granulométrique des prélèvements a été étudiée par microscopie électronique à balayage (Figure II.2). La surface spécifique des particules a quant à elle été déterminée par porosimétrie à azote. L'analyse chimique a permis de déterminer la composition en ions des échantillons, par chromatographie ionique, ainsi qu'en métaux et métalloïdes, par spectroscopie atomique à l'aide d'un plasma inductif couplé à un spectromètre de masse (ICP/MS), en composés organiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS), après désorption thermique des composés légers et extraction au Soxhlet des composés lourds. Enfin, les composés chlorés (PCDD/F et PCB) ont été analysés par 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 caractéristiques de chaque campagne d'échantillonnage, ainsi que les principales caractéristiques physico-chimiques des échantillons de $PM_{2.5}$ sont reprises dans le Tableau II.1.

2.3. Préparation des $PM_{2.5}$ pour les études toxicologiques

Les particules ont été remises en suspension à la concentration souhaitée, soit directement dans le milieu de culture complet pour l'exposition des cellules BEAS-2B, ou dans le DMSO pour être utilisées au cours du test d'Ames. Afin d'éviter la formation d'agrégats, les suspensions de particules ont été soumises aux ultrasons pendant 5 min immédiatement avant l'exposition des cellules. Les suspensions reconstituées dans le DMSO ont été irradiées aux rayons ultra-violet (lampe UV de poste de sécurité microbiologique, puissance théorique = $40 \mu W / cm^2$) pendant 2 heures, afin de limiter les contaminations par la fraction biologique des $PM_{2.5}$.

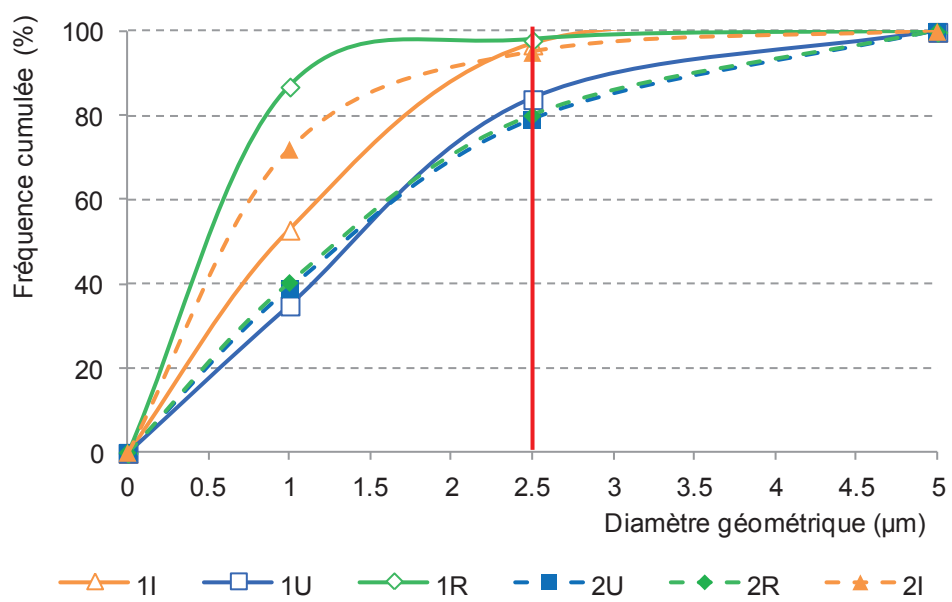


Figure II.□ : Distribution granulométrique des échantillons de PM_{2.5} d'origine industrielle (I), urbaine (U) ou rurale (R), collectées au cours de la saison printemps-été (1) ou automne-hiver (2).

3. MATERIELS BIOLOGIQUES

3.1. Souches de *Salmonella typhimurium*

Le test d'Ames a été conduit sur trois souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA102 et YG1041). Ces souches présentent des caractéristiques et des sensibilités différentes, permettant ainsi d'évaluer la contribution relative des familles de composés chimiques à la mutagénicité des PM_{2.5} (Tableau II.2).

3.2. Cellules BEAS-2B

Notre étude a été réalisée sur les 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 mutation 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).

	Printemps-été 2008			Automne-hiver 2008-2009		
	Industrie	Residential	Urban	Industrie	Residential	Urban
Caractéristiques générales						
Durée (semaines)	25	26	24	23	23	31
Concentration min ($\mu\text{g} / \text{m}^3$)	11,5	9,9	2,8	15,4	12,9	1,9
Caractéristiques physico-chimiques						
Granulométrie (% $\text{PM}_{2.5}$)	97%	84%	98%	95%	79%	80%
Surface spécifique (m^2 / g)	5,2	3,5	2,8	6,2	5,7	5,3
Composition chimique (g / g)						
Aluminium	39 366	14 136	20 681	26 522	22 227	46 912
Baryum	502	307	234	240	350	421
Chrome	414	389	215	101	119	153
Cuivre	1671	874	397	559	949	2 384
Fer	107 346	41 947	26 505	85 630	40 453	22 545
Manganèse	6 115	1 820	1 103	2 257	1 171	573
Nickel	245	191	108	170	226	133
Plomb	464	376	419	430	352	356
Titane	818	731	353	320	300	270
Zinc	2 820	1 776	1 135	1 757	1 010	574
Total métaux	266 025	159 299	95 061	117 986	67 151	74 321
dont de transition	119 429	47 728	29 816	90 794	44 228	26 632
Composés inorganiques						
Sulfate	71 930	48 480	33 210	62 498	72 925	50 426
Nitrate	68 140	86 440	50 540	35 617	70 644	57 742
Ammoniac	5 150	19 530	10 290	< LD	22 460	30 305
Composés organiques						
Acénaphthylène	0,3	0,09	0,12	0,08	0,24	0,56
Fluoranthène	1,58	2,52	2,8	2,06	8,5	25,92
Fluorène	0,08	0,08	0,22	<LD	<LD	<LD
Naphtalène	63,61	37,53	0,34	24,14	<LD	<LD
Phenantrène	0,89	1,29	1,23	0,83	1,8	11,76
Pyrène	1,22	2,08	2,26	2	8,26	25,05
Anthracène	0,17	0,44	0,24	0,27	0,97	1,7
Benzo[ghi]pérylène	3,24	3,95	6,82	18,39	16,48	28,26
Chrysène	1,92	2,65	4,79	24,09	27,05	52,54
Benzo[a]anthracène	1,53	2,01	4,5	15,44	13,36	26,19
Benzo[b]fluoranthène	6,24	7,16	12,76	28,39	30,01	49,9
Benzo[k]fluoranthène	1,65	1,49	2,83	8,65	8,09	14,94
Indeno[123cd]pyrène	3,74	4,55	6,7	12,54	<LD	<LD
Benzo[a]pyrène	1,95	3,02	6,11	13,6	12,14	23,41
Dibenzoanthracène	0,72	0,78	1,36	<LD	12,29	27,34
Total HAP	96,4	77,2	68,3	147,3	161,7	329,9
Total B[a]P-CEC	6,98	8,55	15,73	55,27	90,98	183,4
Composés organochlorés						
PCDD	73	13	203	85	37	16
I-TEQ (PCDD)	0,32-0,34	0,13-0,15	0,40-0,42	0,83	0,3-0,4	0,1-0,2
PCDF	20	8	10	30	13	5
I-TEQ (PCDF)	0,81	0,37	0,47	0,82	0,4	0,16
DL-PCB	65	60	42	113	87	79
TE (DL-PCB)	0,17-0,18	0,06-0,07	0,01-0,06	0,02-0,07	0,01-0,07	0,01-0,06
PCB marqueurs	652	594	499	791	542	363

Annexe II : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de $\text{PM}_{2.5}$.

4. METHODES

Les astérisques associés à certaines méthodes désignent les techniques nouvellement mises en place au laboratoire dans le cadre de ce travail.

4.1. Caractérisation de la fraction biologique *

Cette caractérisation a été réalisée en collaboration avec le Dr Eric DEHECQ du Laboratoire de Biologie de l'Hôpital Saint Philibert, appartenant au groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille.

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

Principe

L'existence d'une fraction biologique au sein des aérosols atmosphériques est un paramètre souvent négligé lors de la caractérisation de prélèvements des particules fines. Pourtant, les éléments bactériens et fongiques contenus dans les particules peuvent jouer un rôle dans les effets toxiques des PM_{2.5} en stimulant par exemple les macrophages alvéolaires (Becker *et al.*, 2002a, 2005a). Nous avons donc cherché à caractériser la richesse et la diversité de cette fraction biologique, par une mesure du nombre de cellules fongiques et bactériennes viables et une identification des espèces présentes.

Protocole

Nous avons réalisé cette caractérisation pour chacun des six prélèvements de PM_{2.5}. Pour ce faire, les particules ont été pesées (environ 1,5 mg) et remises en suspension dans 100 µL d'eau ultrapure. Pour chaque prélèvement de PM_{2.5}, deux types géloses ont étéensemencées (une Sabouraud et une au sang), chacune avec 50 µL de la suspension. La gélose Sabouraud est un milieu pauvre permettant la culture des moisissures et levures, la gélose au sang frais est un milieu riche utilisé pour l'étude bactériologique. Les géloses ont été incubées à 25°C, pendant 48 à 72 h pour la bactériologie et 72 à 120 h pour la mycologie.

Analyse

A la fin du temps d'incubation, les colonies ont été dénombrées à deux reprises, par deux manipulateurs différents. Le nombre de colonies a ensuite été rapporté à la masse initiale de particules, afin de calculer le nombre d'unités formant des colonies (Colony-Forming Units, CFU) par mg de PM_{2.5} pour chacune des deux géloses. Les colonies bactériennes ont ensuite été identifiées grâce à leurs caractéristiques macroscopiques (taille, aspect, couleur),

	□A□□	□□□0□□	□A□0□
Sensibilité aux antibiotiques	Tétracycline	Tétracycline	Kanamycine
Résistance aux antibiotiques	Ampicilline	Ampicilline & Kanamycine	Ampicilline & Tétracycline
Résistance aux UV	non	non	oui
Conditions de culture	Ampicilline 24 µg/mL	Ampicilline 24 µg/mL Kanamycine 24 µg/mL	Ampicilline 24 µg/mL Tétracycline 10 µg/mL
Type de mutation détecté	<i>frameshit</i>	<i>frameshit</i>	substitution
Sensibilité aux mutagènes	composés organiques capables de former des adduits encombrants HAP (+S9)	nitro-aromatiques (- S9) amino-aromatiques (+S9)	composés agissant via un stress oxydant
Taux Réversion Spontanée	20 - 25 colonies	80 - 100 colonies	300 - 400 colonies
Seuil Facteur d'Induction	2	1,5 - 2	1,3 - 1,4
Contrôle positif	sans S9 mix avec S9 mix	2-nitrofluorène 2,5 µg 2-aminofluorène 0,5 µg	2-nitrofluorène 0,5 µg 2-aminofluorène 0,1 µg BuOOH 2 µmol
Autres caractéristiques		Activités nitroréductase et O-acétyltransférase	

□□□□e□u ll.□ : Caractéristiques des souches de *Salmonella typhimurium* utilisées.

microscopiques (Gram, forme, sporulation) et biochimiques (hémolyse, activité oxydase, activité catalase). Les colonies fongiques ont quant à elles été identifiées sur la base d'observation macroscopiques (taille, couleur, aspect) et microscopiques (mycélium, spores, conidiophores).

4.2. Test d'Ames

Principe

Le test d'Ames permet d'évaluer la mutagénicité d'un composé. Il repose sur l'utilisation de souches de *Salmonella typhimurium* déficientes en une enzyme de synthèse de l'histidine et donc incapables de croître sur un milieu dépourvu de cet acide aminé. Ces souches auxotrophes sont mises en contact avec les particules à tester qui, si elles sont mutagènes, induisent des mutations permettant la restauration des capacités de synthèse de l'histidine par les bactéries (Figure II.3).

Protocole

Le protocole utilisé est basé sur la méthode classique (Maron and Ames, 1983), modifiée pour l'étude des PM_{2.5} en réduisant les volumes utilisés et en incluant une période de pré-incubation avant l'étalement selon le protocole décrit par André *et al.* (André *et al.*, 2011). Nous avons réalisé les tests sur chacune des trois souches décrites précédemment, exposée aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 5 ; 25 ou 50 µg / boîte, avec ou sans activation métabolique par la fraction S9 de microsomes hépatiques de rats induits par l'Aroclor-1254. Un témoin positif, spécifique de la souche utilisée et de la présence ou non de S9, a également été inclus dans chaque série.

La souche a été décongelée et cultivée en suspension pendant 16 h à 37°C. Cent µL de culture bactérienne ont ensuite été prélevés, aux ont été ajoutés 10 µL de DMSO contenant la substance à tester, ainsi que 100 µL de S9 (test avec activation métabolique) ou de tampon phosphate pH 7,4 (test sans activation métabolique). Ce mélange a été incubé 1 h à 37°C sous agitation rapide, avant l'ajout de 2 mL d'agar mou (agarose 0,6 % ; NaCl 0,5 % ; m/v ; traces d'histidine et de biotine) et l'étalement sur une boîte de pétri de 90 mm de diamètre, dans laquelle 20 mL de milieu minimum (agarose 1,5 % ; glucose 1% ; *Nutrient Broth n°2* 2% ; m/v) avaient été coulés au préalable.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 48 h, avant d'être lues de manière automatique grâce au logiciel *Visilog* (Noesis, Gif sur Yvette, France). Les particules comportant une fraction biologique riche, le masque de lecture a été redéfini afin d'éliminer

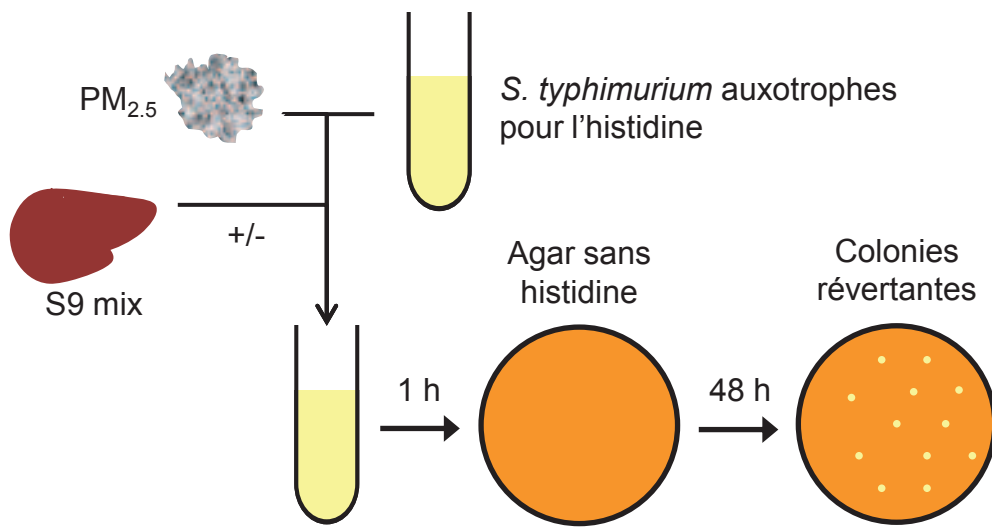


Figure II.□: Principe du test d'Ames.

les zones contaminées lors du comptage. La toxicité des particules a été évaluée en parallèle, par l'observation microscopique de la densité de la pousse de fond.

Analyse

Pour chaque condition testée, le Facteur d'Induction (FI) a été obtenu en rapportant nombre de révertants par boîte au Taux de Réversion Spontanée (TRS, nombre moyen de révertants dans les boîtes non-exposées) calculé pour chaque expérience en remplaçant les PM_{2.5} par 10 µL de DMSO. Chaque condition (DMSO ; PM_{2.5} 5 ; 25 ou 50 µg) a été analysée sur trois réplicats et l'expérience reproduite au cours de deux manipulations indépendantes. Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type. Ceux obtenus sur la souche YG1041 ont de plus fait l'objet d'une analyse de régression linéaire.

4.3. Culture et exposition des cellules

4.3.1. Conditions de culture

L'ensemencement des cellules BEAS-2B a été réalisé 24 h avant l'exposition, dans des plaques ou flacons de culture 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.

Selon les analyses, différents types de supports de culture ont été utilisés à savoir :

- des plaques 96 puits pour les tests de cytotoxicité,
- des plaques 12 puits pour les tests des comètes et des micronoyaux,
- des plaques 6 puits pour les mesures d'EMX et d'activité EthoxyRésorufine-O-Dééthylase (EROD),
- des flacons de culture de 75 cm² pour les autres mesures.

4.3.2. Exposition

Des cellules non-exposées ont été utilisées comme témoin dans chaque expérience. Le nombre de leurs réplicats a systématiquement été doublé par rapport à celui considéré pour les cellules exposées.

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

- les échantillons de particules à une concentration de :
 - o 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les tests de cytotoxicité,
 - o 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour tous les autres paramètres étudiés,
- du TiO_2 à une concentration de 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$,
- du B[a]P à une concentration de :
 - o 1 μM pour les mesures d'EMX, l'activité EROD et le post-marquage,
 - o 50 μM pour les paramètres de génotoxicité et épigénétiques.

Le temps d'exposition a été fixé à 72 h pour toutes les analyses, hormis les mesures de cytotoxicité, d'expression des EMX et d'activité EROD, pour lesquelles une étude cinétique (24 h, 48 h et 72 h) a été réalisée.

4.3.3. Récupération

A la fin de la période d'exposition (ou du temps de récupération pour le test des micronoyaux), le milieu de culture a été éliminé et les cellules rincées 2 fois au PBS préalablement chauffé à 37°C. Différentes méthodes de récupération et de conservation ont ensuite été employées, selon les analyses auxquelles étaient destinées les cellules.

Les plaques 6 puits contenant les cellules destinées au dosage des ARNm des EMX et à l'activité EROD ont été vidées puis directement congelées à -80° jusqu'à leur utilisation.

Les cellules destinées au post-marquage au ^{32}P , au *Western-Blot*, à la PCR méthylation spécifique et au dosage des miRNA ont été décollées à l'aide de trypsine - EDTA contenant 0,5 % (m/v) de PVP, puis 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.

Enfin, le test des comètes, le test des micronoyaux et la fixation des cellules pour les études de cytométrie en flux ont été réalisés directement sur des cellules fraîches, décollées et centrifugées comme précédemment.

4.4. Tests de cytotoxicité

Principe

La cytotoxicité des prélèvements de $PM_{2.5}$ peut être évaluée en utilisant différentes méthodes complémentaires, telles que :

- la mesure de l'activité LacticoDésHydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture, reflet de la perte d'intégrité membranaire,
- la mesure de l'activité des DésHydrogénases mitochondriales (DHm) dans les cellules, qui permet d'évaluer l'activité mitochondriale,
- la mesure de l'incorporation de 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine, qui est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé.

Le dosage de la LDH repose sur la co-transformation du lactate en pyruvate et d'un sel de tétrazolium de couleur jaune en formazan de couleur rouge. La mesure de l'activité DHm est basée sur la transformation directe d'un sel de tétrazolium (WST-1) de couleur rouge pâle en formazan de couleur rouge brique. Pour ces deux tests, la concentration en formazan peut être déterminée par colorimétrie. L'incorporation de BrdU est quant à elle mesurée par méthode ELISA, à l'aide d'anticorps anti-BrdU couplés à une peroxydase, révélés par l'ajout d'un substrat chromogène. Comme précédemment, la quantité de BrdU est mesurée par colorimétrie.

L'utilisation de ces trois méthodes permet d'appréhender la toxicité des $PM_{2.5}$ à différents niveaux subcellulaires.

Protocoles

L'étude de cytotoxicité a été réalisée en utilisant les kits *Cytotoxicity Detection LDH*, *Cell Proliferation Reagent WST-1* et *Cell Proliferation ELISA BrdU* (Roche Diagnostics, Meylan, France), selon les instructions du fabricant. Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur des cellules BEAS-2B exposées ou non pendant 24, 48 ou 72 h aux différents échantillons de $PM_{2.5}$ à des concentrations de 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ou 120 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. Pour chaque échantillon de $PM_{2.5}$ et chaque temps, deux plaques de culture 96 puits ont étéensemencées. Les cellules ont été exposées 24 h plus tard aux échantillons de $PM_{2.5}$, selon le schéma présenté en Figure II.4. Une colonne de cellules exposées au Triton-X100 1 % (v/v) (témoin positif 100 % de mortalité), a également été ajoutée sur chaque plaque. Simultanément, 10 μL de BrdU ont été ajoutés dans les plaques destinées au dosage correspondant.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Milieu sans cellules							
2	Cellules non-exposées							
3								
4	PM _{2.5} 3,75 µg / cm ²							
5	PM _{2.5} 7,5 µg / cm ²							
6	PM _{2.5} 15 µg / cm ²							
7	PM _{2.5} 30 µg / cm ²							
8	PM _{2.5} 45 µg / cm ²							
9	PM _{2.5} 60 µg / cm ²							
10	PM _{2.5} 90 µg / cm ²							
11	PM _{2.5} 120 µg / cm ²							
12	Triton X-100 1 %							

Figure II. □ : Schéma d'exposition des microplaques pour les tests de cytotoxicité.

A la fin du temps d'exposition (24, 48 ou 72 h), 100 µL de surnageant ont été transférés de la plaque destinée au dosage WST-1 vers une plaque vide, afin de procéder au dosage de l'activité LDH extracellulaire. Les réactifs LDH et WST-1 ont été ajoutés dans les plaques correspondantes, à raison de 100 et 10 µL / puits, respectivement. Les plaques ont été lues après 20 et 30 min d'incubation à 37°C pour la mesure LDH, ou après 2 et 3 h pour le test WST-1. Dans les deux cas, la concentration en formazan a été déterminée à 492 nm et une mesure à 600 nm a été prise comme référence, grâce à un lecteur de microplaques de type Multiskan (Thermo Fisher Scientific).

Le dosage de l'incorporation de BrdU a été réalisé sur la seconde microplaque. Le milieu de culture contenant la BrdU non-incorporée a tout d'abord été éliminé. Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées par une incubation de 30 min à température ambiante dans la solution *FixDenat*. Cette solution a été éliminée puis les cellules ont été incubées pendant 90 min dans une solution contenant l'anticorps anti-BrdU-péroxydase, elle-même éliminée par retournement puis lavage au PBS. Le substrat chromogène a ensuite été ajouté, puis incubé pendant 20 min pour permettre le développement de la coloration. La réaction a été stoppée par ajout d'acide sulfurique, puis la plaque lue à 450 nm et à 690 nm (longueur d'onde de référence), à l'aide du lecteur Multiskan.

Analyse

Les valeurs d'absorbance à la longueur d'onde de référence ont été soustraites à celles obtenues à la longueur d'onde d'intérêt pour chaque puits. L'absence de signal dans les puits sans cellules a été vérifiée, puis la différence de densité optique a été représentée en fonction de la concentration en PM_{2.5}. Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [1^{er} quartile ; 3^{ème} quartile] ([Q1;Q3]) de huit réplicats biologiques.

4.5. Dosage des protéines par méthode BCA

Principe

Il est possible de doser les protéines contenues dans un échantillon par l'utilisation d'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode repose sur la formation de complexe protéines-Cu²⁺ en conditions alcalines, suivie par la réduction du Cu²⁺ en Cu⁺. Cette réduction étant catalysée par la liaison peptidique et par certains acides-aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine), la quantité de Cu⁺ formée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. Le BCA forme ensuite des complexes colorés avec le Cu⁺, dont la concentration peut être déterminée par colorimétrie. Il est possible de doser les protéines

contenues dans les échantillons en comparant leur absorbance à 562 nm à une gamme standard d'albumine sérique de bœuf (BSA). Cette méthode a été utilisée dans plusieurs expériences décrites ci-après.

Protocole

Le kit *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour doser les protéines, en adaptant le protocole à de faibles volumes. Pour ce faire, la solution de BSA à une concentration initiale de 1 mg / mL a été diluée dans le tampon contenant les échantillons (cf. protocoles décrits ci-après) afin d'obtenir les concentrations suivantes : 800 ; 600 ; 400 ; 200 ; 100 ; 50 et 0 µg / mL.

Les standards et les échantillons (éventuellement dilués) ont ensuite été déposés en double dans une microplaque 96 puits, à raison de 25 µL par puits. La solution de travail a été préparée en mélangeant les solutions de BCA et de sulfate de cuivre (II) pentahydraté (50/1, v/v). Ce réactif a été ajouté aux échantillons à raison de 200 µL par puits, puis la plaque incubée pendant 30 min à 37°C sous agitation légère.

L'absorbance des solutions contenues dans chaque puits a été déterminée à 562 nm grâce au lecteur Multiskan.

Analyse

La linéarité de la droite de régression correspondant à la gamme de BSA a été vérifiée ($R^2 > 0,95$). L'équation obtenue pour cette gamme a été utilisée pour calculer les concentrations en protéines dans chacun des échantillons. Les échantillons dont l'absorbance était supérieure à celle du point de gamme le plus haut ont été dilués.

4.6. Détermination de l'expression des EMX par RT-qPCR

Principe

La méthode de *real-time quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR, PCR quantitative en temps réel), précédée d'une étape de Rétro-Transcription (RT) des ARNm contenus dans les cellules, permet la détermination du niveau d'expression de gènes cibles dans les cellules et la comparaison de ces niveaux entre les différentes expositions. Cette méthode comprend plusieurs étapes permettant successivement :

- l'extraction des ARN (ici sans purification)
- la rétro-transcription des ARNm en ADNc (RT)
- l'amplification et la quantification des ADNc (qPCR)

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé la chimie TaqMan[®]. Cette dernière repose sur l'utilisation, pour chaque gène cible, d'un couple d'amorces (*primers*) et d'une sonde (*probe*) spécifiques. Les amorces sont choisies à la jonction exon-exon, évitant ainsi l'amplification d'un éventuel ADN génomique résiduel et assurant la spécificité de la réaction. La sonde est associée à un « Minor Groove Binder » (MGB[®]), qui augmente la température de fusion (T_m) de la sonde et stabilise son interaction avec la matrice d'ADN. Il est ainsi possible d'utiliser des sondes de plus petite taille, constituées de 12 à 20 bases contre 25 à 30 pour les sondes TaqMan[®] classiques. La méthode gagne alors en sensibilité, car l'efficacité du quenching est améliorée par la faible longueur de la sonde. La sonde MGB[®] permet également d'éviter au maximum les mésappariements, ce qui accroît leur spécificité (Figure II.5).

Protocole

Nous avons quantifié les ARNm de quatre EMX cibles (CYP1A1, CYP1B1, CYP2S1, NQO1) dans des cellules exposées ou non pendant 24, 48 ou 72 h aux différents échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, au B[a]P, ou au TiO₂. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit *TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-C₇TM* (Life Technologies), selon les instructions du fournisseur et en incluant l'étape de digestion de l'ADNg.

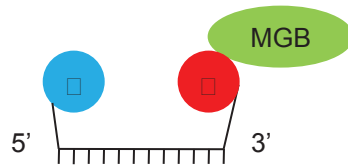
L'extraction des ARN a été réalisée en ajoutant 50 μL de tampon de lyse contenant 1% (v/v) de DNase I directement dans les puits. Après 5 min d'incubation à température ambiante, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 5 μL de solution stop et une incubation de 2 min à température ambiante. Les lysats cellulaires ont ensuite été placés sur la glace puis déposés dans une plaque 96 puits pour la RT.

La RT a été réalisée à partir de 2 μL de lysat cellulaire ou d'eau *nuclease free* (contrôle négatif de RT) auxquels ont été ajoutés 18 μL de mélange réactionnel contenant :

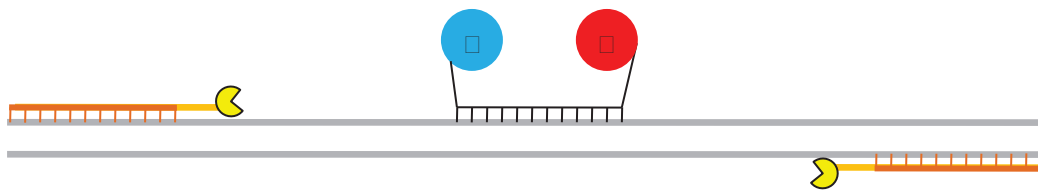
- 10 μL de RT Buffer 2X
- 1 μL de RT Enzyme Mix
- 7 μL d'eau ultra-pure.

La RT a été réalisée en utilisant le thermocycleur *7500 Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies) programmé comme suit :

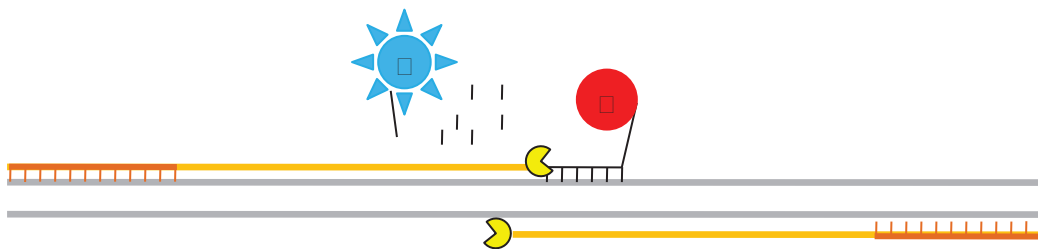
- 60 min à 37°C (rétro-transcription)
- 5 min à 95°C (inactivation)
- maintien à 4°C.



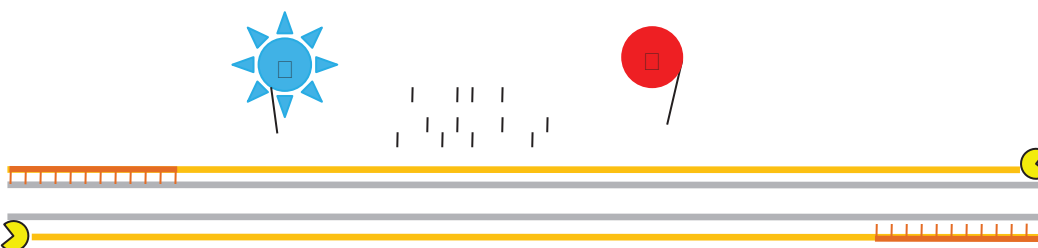
A. La sonde est composée de 12 à 20 bases, auxquelles sont ajoutés un Rapporteur (R) en 5' et un Quencher (Q) en 3' qui empêche le rapporteur d'émettre sa fluorescence. Le Minor Groove Binder (MGB) est également situé en 3', associé au quencher. Dans un souci de simplification, le MGB n'est plus représenté dans les étapes suivantes, mais reste associé au quencher.



B. Hybridation et début de l'élongation, la Taq polymérase progresse le long du brin. Lorsque la sonde Taqman[®] est hybridée, la fluorescence du rapporteur est quenchée.



C. Poursuite de l'élongation, l'activité 5'>3' exonucléase de la Taq polymérase permet le clivage progressif de la sonde, libérant le rapporteur. Le rapporteur n'est alors plus quenché et devient fluorescent.



D. Fin de l'élongation, la sonde TaqMan[®] est totalement dégradée.

Figure II.□: Structure et principe de fonctionnement de la sonde TaqMan[®].

Les produits de RT ont ensuite été répartis sur différentes plaques pour procéder aux PCR. Les plaques n'étant pas utilisées immédiatement ont été stockées à -20°C.

La PCR a été réalisée à partir de 2 µL d'ADNc (échantillons ou contrôle de RT) ou d'eau ultra-pure (contrôle négatif de PCR) auxquels ont été ajoutés 18 µL de mélange réactionnel contenant :

- 10 µL de TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2X
- 1 µL de *TaqMan® Gene Expression Assay*, spécifique de la cible :
 - o ARN 18S : référence Hs99999901_s1 (contrôle endogène)
 - o CYP1A1 : référence Hs00153120_m1
 - o CYP1B1 : référence Hs00381672_m1
 - o CYP2S1 : référence Hs00258076_m1
 - o NQO1 : référence Hs02512143_s1
- 7 µL d'eau ultra-pure.

La PCR a été réalisée sur le même appareil que la RT, configuré en mode « *Fast* », selon le protocole suivant :

- 20 s à 95°C (activation de la Taq polymérase)
- 40 cycles d'amplification :
 - o 3 s à 95°C (dénaturation)
 - o 30 s à 60°C (hybridation-élongation & collecte des données).

Analyse

Les résultats de l'amplification ont été visualisés en temps réel et exprimés sous la forme de ΔR_n (différence entre l'intensité de fluorescence émise par le rapporteur et le bruit de fond de fluorescence) en fonction du nombre de cycles d'amplification. Pour chaque gène, le cycle seuil (Cycle threshold, Ct), défini comme le nombre de cycles d'amplification permettant une augmentation significative de l'intensité de fluorescence au delà de la ligne de base, a été déterminé grâce au logiciel *Sequence Detection Software v.2.0.3*.

Les calculs ont ensuite été réalisés selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par Livak et Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001). La valeur du Ct correspondant à l'ARN 18S, utilisé comme contrôle endogène, a été retranchée au Ct du gène cible pour obtenir le ΔCt pour chaque cible et chaque échantillon de cellules :

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{cible}} - Ct_{18S}$$

Utiliser cette valeur lors des calculs ultérieurs rend possible les comparaisons entre les résultats des différentes expositions. En effet, l'ARN 18S est exprimé de manière forte et ubiquitaire. Son ADNc peut donc être utilisé pour normaliser les résultats, afin de s'affranchir d'éventuelles variations de qualité des ARN et/ou d'efficacité de RT.

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 :

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

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

4.7. Activité EROD

Principe

L'activité EROD est le reflet quasi-exclusif (95 %) de l'activité catalytique des CYP1A1 (80 %) et 1B1 (15 %) (Chahin *et al.*, 2013). Cette activité peut être mesurée dans les microsomes, fragments de membrane du réticulum endoplasmique, obtenus après ultracentrifugation de lysats cellulaires.

La méthode de dosage repose sur la quantification, par spectrofluorimétrie, de la quantité de résorufine formée en mettant un contact des microsomes préalablement isolés et de l'éthoxy-résorufine pendant une durée déterminée.

Protocole

Nous avons mesuré l'activité EROD dans des cellules exposées ou non pendant 24, 48 ou 72 h aux différents échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm², au B[a]P, ou au TiO₂.

Les cellules ont été lysées par grattage et ajout de 500 µL de *Cell Lysis Buffer*, directement dans les puits. Après 5 min d'incubation sur glace, la réaction a été arrêtée en ajoutant 50 µL de *Stop Solution*. Les débris cellulaires de grande taille ont été éliminés par centrifugation des lysats à 20 000 g pendant 10 min (4°C). Les surnageants obtenus ont ensuite été soumis à une ultracentrifugation de 1 h à 110 000 g (4°C).

Les culots contenant les microsomes ont alors été resuspendus dans 200 µL de PBS-EDTA (1 mM) et leur contenu en protéines déterminé par dosage BCA.

La mesure de l'activité EROD a été déterminée selon la méthode décrite par Donato et al (Donato *et al.*, 1999). Pour ce faire, 40 µL de suspension de microsomes ont été mélangés à 10 µL de mélange réactionnel afin d'obtenir les concentrations suivantes :

- MgCl₂ 5 mM
- NADP 1 mM
- glucose-6-phosphate 10 mM

- glucose-6-phosphate déshydrogénase 0,3 U / mL
- éthoxy-résorufine 10 μ M.

Après 15 min d'incubation à 37°C, la réaction a été stoppée en ajoutant 50 μ L de méthanol.

La quantité de résorufine formée a été mesurée par une lecture spectrofluorimétrique (λ_{ex} : 544 nm ; λ_{em} : 590 nm) à l'aide du lecteur de microplaque Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France ; logiciel : *Ascent* v2.6).

Analyse

La quantité de résorufine formée a été calculée à partir de l'équation polynomiale du second degré correspondant à la gamme de résorufine réalisée en parallèle des échantillons sur chaque plaque. Les résultats ont ensuite été normalisés par rapport à la quantité de protéines, et divisés par le temps d'incubation afin d'obtenir un taux de formation de résorufine (en nmol) par minute et par mg de protéines. Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

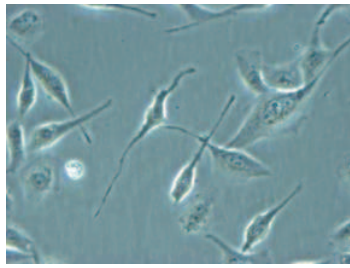
4.8. Post-marquage au ^{32}P

Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le Dr Véronique ANDRÉ, de l'EA4651 Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements de l'Université de Caen - Basse Normandie et du Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse de Caen.

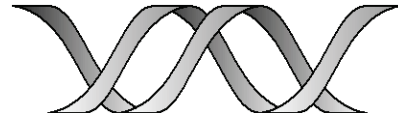


Principe

Parmi les nombreux composés organiques détectés au sein des particules collectées, un certain nombre de HAP, dont le B[a]P après transformation métabolique en BPDE, sont capables de former des adduits dits « encombrants » à l'ADN des cellules exposées. Ces adduits de grande taille peuvent être détectés par post-marquage au ^{32}P . Le principe de cette méthode de marquage radioactif repose sur la phosphorylation en 5' au ^{32}P des nucléotides modifiés par la PNK. L'échantillon est traité à la NP1 après hydrolyse, afin de déphosphoryler les nucléotides non-modifiés en position 3', alors que l'encombrement stérique lié à la présence d'adduits empêche l'accès de la NP1 à ce site. Les nucléotides sont ensuite marqués à la PNK, qui présente la particularité d'avoir une activité 3' phosphate-dépendante. Ainsi, seuls les nucléotides portant des adduits encombrants sont marqués, et peuvent donc être détectés après séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).

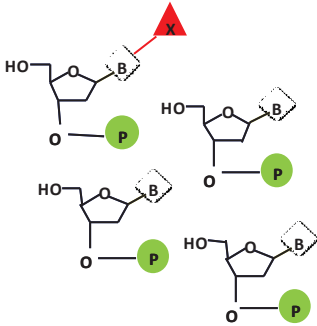


1. Extraction de l'ADN



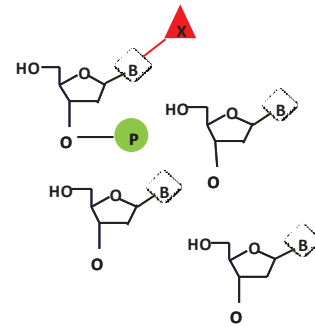
2. Hydrolyse

nucléase micrococcale + SPD



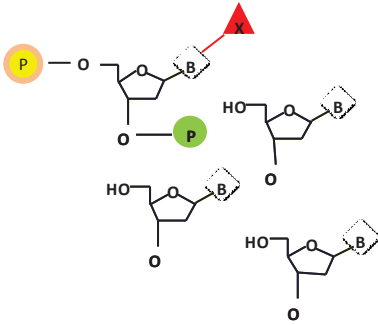
3. Enrichissement

NP1



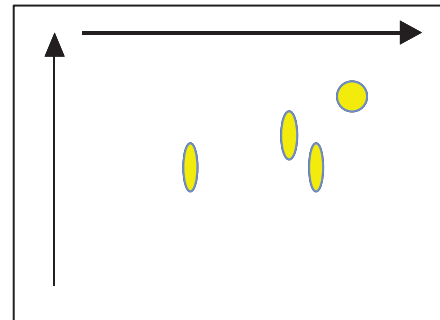
4. Marquage

PNK



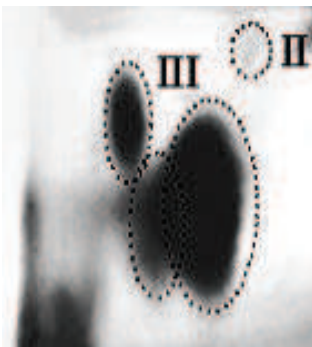
5. Séparation

CCM

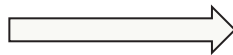


6. Révélation

autoradiographie



7. Quantification relative



compteur à scintillations

RAL

Figure II.6 : Principe du dosage des adduits encombrants à l'ADN par post-marquage au ^{32}P .
SPD : PhosphoDiesterase de Rate de veau ; NP1 : Nucléase P1 ; PNK : T4 PolyNucléotide Kinase ; CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; RAL : Relative Adduct Level.

Protocole

Le protocole employé (Figure II.6) a été basé sur la méthodologie standardisée décrite par Reddy et Randerath (Reddy and Randerath, 1986) et appliqué aux cellules BEAS-2B exposées ou non pendant 72 h aux $PM_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, au B[a]P, ou au TiO_2 . Un échantillon d'ADN provenant d'un plasmide (contrôle négatif) et un échantillon d'ADN de thymus de veau exposé au BPDE (fourni par le Dr F. Beland) utilisés comme témoin positif (110 adduits / 10^8 nucléotides) ont été ajoutés lors de chaque manipulation.

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 1,2 mL de tampon Tris-HCl (EDTA, pH 7,4), contenant 10 % de SDS, de la RNase T1 et de la RNase A. Après 30 min d'incubation à 37°C, les protéines ont été éliminées par 30 min de traitement à la protéinase K à 37°C. L'ADN a ensuite été extrait par un mélange phénol/Sevag 1/1 (v/v) puis Sevag (chloroforme/alcool isoamylique 24/1). L'ADN a été précipité dans le l'éthanol froid, rincé à l'éthanol, séché et resuspendu dans de l'eau ultra-pure.

La pureté des ADN extraits et leur concentration ont été déterminées par un spectre UV (228-300 nm), pour lequel les ratios attendus étaient :

- compris entre 1,8 et 1,95 pour le rapport A_{260} / A_{280}
- supérieur à 2,3 pour le rapport A_{260} / A_{230} .

Leur concentration a quant à elle été établie grâce à la relation :

$$1 \text{ unité } A_{260} = 50 \text{ ng} / \mu\text{L d'ADN.}$$

La quantification des adduits encombrants à l'ADN a été réalisée par post-marquage au ^{32}P . Pour ce faire, 5 μg d'ADN ont été digérés à la nucléase micrococcale et à la SPD durant 3,5 h à 37°C. L'enrichissement en nucléotides modifiés a été réalisé par 30 min de traitement à la NP1, stoppée par l'ajout de 1,8 mL de Tris-base. Le marquage des adduits a été fait pendant 30 min à 37°C par l'ajout de 10 unités de PNK et de 30 μCi de ^{32}P - γATP par échantillon.

La séparation des adduits a été réalisée par CCM sur des plaques de cellulose modifiée polyéthylènimine (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Quatre solvants de migration ont été utilisés successivement :

- D1 : phosphate de sodium 1 M ; pH 6,8 (overnight)
- D2 : urée 8,5 M et formate de lithium 4,5 M ; pH 3,5 (3 h)
- D3 : urée 8,5 M, Tris-HCl 0,5 M et chlorure de lithium 1,6 M ; pH 8 (3 h)
- D4 : phosphate de sodium 1,7 M ; pH 5 (overnight).

Les autoradiographies permettant la localisation des adduits marqués ont été obtenues en exposant des films Kodak Biomax aux plaques de CCM pendant 24 h à -80°C.

Analyse

Les expériences ont été réalisées au minimum deux fois, à 72 h d'intervalle et à partir de la même source de ^{32}P . La détermination du nombre relatif d'adduits (Relative Adduct Level, RAL) a été réalisée en mesurant la radioactivité (exprimée en coups par minute, cpm) de chaque spot identifié, à l'aide d'un compteur à scintillations et de la formule suivante :

$$\text{RAL}_{\text{spot}} = 110 \cdot 10^{-8} \text{ cpm}_{\text{spot}} / \text{cpm}_{\text{témoin_BPDE}}$$

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3].

4.9. Test des Comètes *

Principe

Ce test, encore appelé « *single cell gel electrophoresis* », permet l'observation de cassures et de sites abasiques au sein de l'ADN nucléaire. En effet, de telles altérations provoquent le relâchement des boucles d'ADN surenroulé, et l'application d'un courant électrique sur les cellules préalablement incluses dans un gel d'agarose et lysées provoque l'extension de ces régions relâchées, visualisables après marquage des acides nucléiques. Ainsi, l'ADN génomique intact constitue la « tête » de la comète de forme arrondie, alors que les régions lésées apparaissent comme la « queue » de la comète, formant un halo partant de la tête et dirigé vers l'anode. L'intensité de ce halo, traduisant le pourcentage d'ADN retrouvé dans la queue, est proportionnelle aux dommages subis par la cellule (Figure II.7).

Protocole

L'évaluation de la fragmentation de l'ADN a été réalisée sur des cellules BEAS-2B exposées ou non pendant 72 h aux échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, au B[a]P, ou au TiO_2 , directement à la fin de la période d'incubation. Un échantillon de cellules exposées 20 min à 1 mM d' H_2O_2 a été utilisé comme contrôle positif.

Le culot cellulaire obtenu après centrifugation a été remis en suspension dans du PBS froid afin d'obtenir une concentration de 2 500 cellules / μL . Trois lames ont alors été réalisées pour chaque condition analysée, hormis le témoin négatif pour lequel huit lames ont été préparées. Pour ce faire, 400 μL d'agarose à 1 % ont été étalés sur chaque lame de verre à une face dépolie, soigneusement nettoyée au préalable. Soixante μL de la suspension cellulaire ont ensuite été ajoutés à 420 μL d'agarose *Low Melting Point* (1,2 %

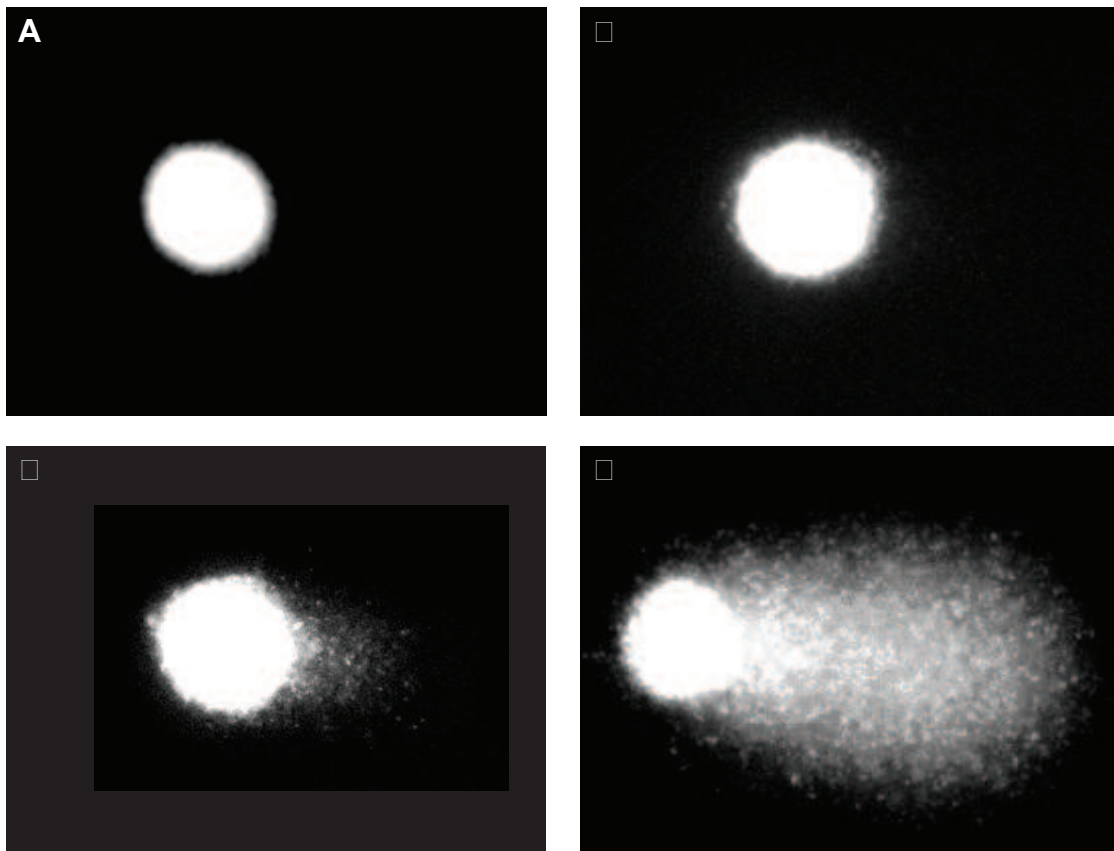


Figure 7 Evolution de l'aspect des noyaux en test des comètes selon l'intensité des dommages, d'un noyau intact (A) à un noyau hautement endommagé (D).

dans du PBS) à 37°C (160 µL + 1 120 µL pour les témoins), puis 130 µL de ce mélange ont été coulés sur chaque lame, immédiatement posée sur la glace.

Les lames ont ensuite été disposées dans une chambre humide à 4°C et recouvertes pour la nuit de tampon de lyse (NaCl 1 mM, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, sodium lauryl sarcosinate 1 %, DMSO 10 %, Triton X-100 1 %, pH 10).

Après un rinçage au Tris-HCl (0,4 mM, pH 7,4), les lames ont été placées pendant 20 min dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon (NaOH 12 g / L, EDTA 372 mg / L, pH 13), avant l'application d'un champ électrique (42 min, 25 V / cm, 300 mA). Après migration, le tampon d'électrophorèse a été neutralisé par 2 rinçages au Tris-HCl.

Les lames ont ensuite été codées et colorées au BET, puis immédiatement lues en aveugle à l'aide d'un microscope de type BX51 muni d'une caméra DP70 et d'une lampe à fluorescence modèle U-RFL-T (Olympus France SAS, Rungis, France) ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 600$ nm).

Analyse

Pour chaque lame, 50 images ont été acquises grâce au logiciel *DPCController* v.2.1.1.183 (Olympus). L'analyse individuelle des comètes a été réalisée grâce au logiciel *CASP* v.1.2.2 (*CASPLab*, GNU public license), fournissant entre autres paramètres le pourcentage d'ADN dans la queue, sélectionné pour les analyses statistiques selon les recommandations de Collins *et al.* (Collins *et al.*, 2008). Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart-type de 2 expériences indépendantes incluant chacune trois lames par condition d'exposition et huit pour les cellules non-exposées. Les analyses ont été réalisées sur la variable $\log(\% \text{ ADN})$.

4.10. Dosage de γ -H2AX *

Principe

La phosphorylation de l'histone H2AX, variant de l'histone H2A, est connue pour être un marqueur de cassures double-brin (Rogakou *et al.*, 1998). Il existe des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de H2AX (γ -H2AX) couplés à des fluorophores, qui peuvent être utilisés en cytométrie en flux. Il est ainsi possible de déterminer la quantité de H2AX phosphorylé pour chaque cellule, puis de répartir ces résultats en fonction de la quantité d'ADN afin d'obtenir une évaluation des cassures double-brin en fonction des phases du cycle cellulaire.

Protocole

La quantification des cassures double-brin a été réalisée sur des cellules BEAS-2B exposées 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, fixées et perméabilisées directement à la fin de la période d'incubation. Un échantillon de cellules exposées à 50 µM d'H₂O₂ pendant 20 min a été utilisé comme contrôle positif.

La fixation des cellules a été obtenue en remettant en suspension le culot cellulaire dans du PBS contenant 2 % (v/v) de formaldéhyde, à une concentration de 1,5.10⁶ cellules / mL. Après 20 min d'incubation à température ambiante, les cellules ont été placées sur la glace pendant une minute avant d'être centrifugées pendant 5 min à 150 g (4°C). Les cellules ont ensuite été perméabilisées en les resuspendant dans 750 µL de méthanol/PBS 9/1 (v/v) glacé. Les cellules ont été stockées à -20°C après 30 min d'incubation sur la glace.

L'anticorps et le tampon contenus dans le kit *Flow Collect γ-H2AX Detection* (Merck-Millipore, Darmstadt, Allemagne) ont été utilisés pour réaliser le marquage. Le marquage γ-H2AX a été réalisé en prélevant 200 µL de la suspension cellulaire. Après une centrifugation de 5 min à 150 g (4°C) permettant de retirer le méthanol, le culot a été resuspendu dans 190 µL de tampon, puis aliquoté en 2 tubes de 95 µL. Cinq µL d'anticorps anti-γ-H2AX (couplé Alexa 488) ont été ajoutés au premier aliquot, alors que le second tube a été marqué à l'aide de 5 µL de contrôle isotypique à la même concentration (*Mouse IgG1 - Alexa 488*, dilué au 1/50^{ème}). Les cellules ont été incubées pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante, centrifugées, puis resuspendues dans 500 µL de PBS. Un marqueur spécifique de l'ADN (*FxCycle Violet Stain*) a été ajouté à une concentration finale de 0,1 % (v/v). L'analyse des cellules a été réalisée après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, à l'aide d'un cytomètre à focalisation acoustique de type Attune[®] (Life Technologies) équipé d'un laser bleu et d'un laser violet, en mode haute sensibilité et à une vitesse d'acquisition de 100 µL / minute.

Analyse

Au moins 15 000 cellules individuelles ont été analysées grâce au logiciel *Flowing Software* v.2.4.1 (Turku Centre for Biotechnology, Finlande). Une nouvelle variable a été créée lors de l'analyse, correspondant au ratio de l'intensité de fluorescence dans le canal BL-1 (530 / 30 *band-pass*, marquage γ-H2AX ou contrôle isotypique) et de l'intensité de fluorescence dans le canal VL-1 (450 / 40 *band-pass*, marquage ADN). L'intensité médiane de fluorescence (Median Fluorescence Intensity, MFI) correspondant à cette variable a ensuite été étudiée dans chacune des phases du cycle cellulaire (Figure II.8).

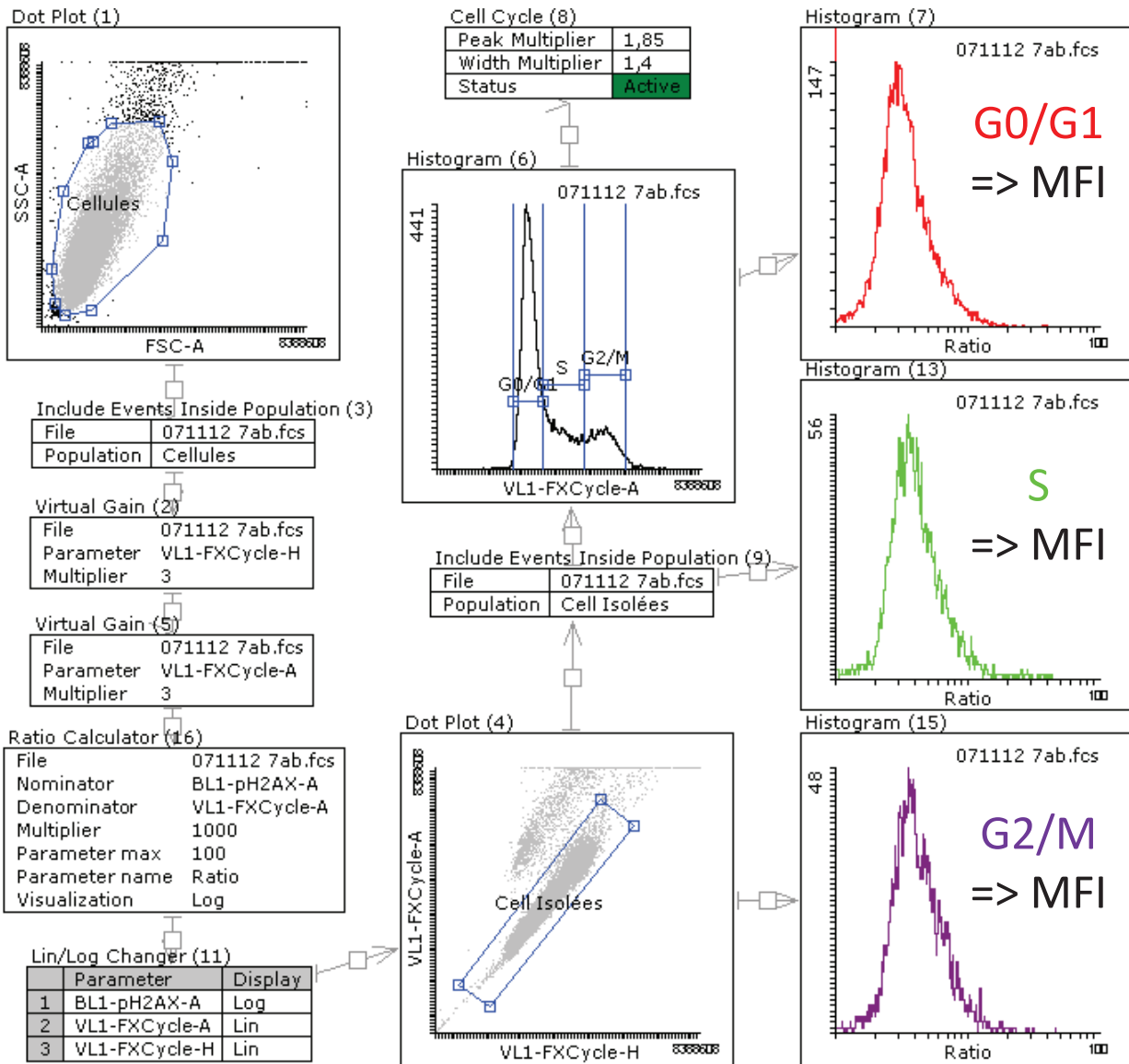


Figure 1 Procédure d'analyse des résultats de cytométrie en flux avec le logiciel *Flowing Software* v.2.4.1 (Turku Centre for Biotechnology).

La comparaison des taux de γ -H2AX a été réalisée en utilisant la relation suivante :

$$\Delta MFI_{\text{échantillon}} = MFI_{\gamma\text{-H2AX}} - MFI_{\text{contrôle_isotypique}}$$

$$\Delta\Delta MFI = \Delta MFI_{\text{exposition}} - \Delta MFI_{\text{cellules_non-exposées}}$$

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

4.11. Formation de micronoyaux *

Principe

Les cassures double-brin de l'ADN non réparées avant la mitose ou les altérations du fuseau mitotique peuvent conduire à des anomalies de répartition des chromosomes lors de la division cellulaire (Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Ceci conduit à la présence de chromosomes ou de fragments de chromosomes dans le cytoplasme des cellules filles, dont la présence peut être révélée par une coloration spécifique de l'ADN après fixation et perméabilisation des cellules (Figure II.9).

Protocole

Le protocole employé est adapté de celui décrit par Merhi *et al.* (Merhi *et al.*, 2012) et appliqué à des cellules BEAS-2B exposées ou non pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, au B[a]P, ou au TiO₂. Un échantillon de cellules exposées pendant 72 h à la mitomycine C (10 ng / mL) a été utilisé comme contrôle positif.

A la fin de la période d'exposition, le milieu de culture a été retiré et les cellules rincées deux fois au PBS chaud (37°C). Les cellules ont ensuite été remises en culture pendant 48 h dans du BEGM frais, afin de permettre la formation éventuelle de micronoyaux. Les cellules ont ensuite été récupérées tel que décrit précédemment.

Après la centrifugation, la quasi-totalité du surnageant a été éliminée et les cellules ont été resuspendues dans le volume restant (500 μL). Les cellules ont ensuite été perméabilisées par un choc hypotonique lors d'une incubation de 1,5 min dans un mélange BEGM/eau ultra-pure (2/1, v/v) ajoutée progressivement. A la fin de l'incubation, les cellules ont été « pré-fixées » par l'ajout de 0,5 mL de Carnoy I (MeOH/CH₃COOH 3/1 v/v) froid (4°C). Une période d'incubation de 1 min à température ambiante a été observée, suivie d'une centrifugation de 5 min à 150 g (4°C). La perméabilisation des cellules a été obtenue en incubant le culot cellulaire dans 5 mL de Carnoy I froid pendant 10 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été centrifugées comme précédemment puis la quasi-totalité du surnageant éliminé. Les cellules ont été remises en suspension dans le volume résiduel (200 μL), puis étalées sur 2 lames de verre préalablement refroidies.

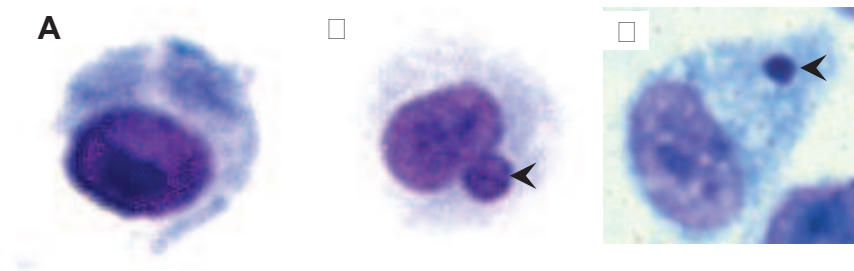


Figure Images de cellules sans micronoyau (A) ou avec micronoyaux (B,C) (x 400).

La coloration a été réalisée après séchage des lames à l'air libre. Pour ce faire, les lames ont été recouvertes d'une solution de Giemsa diluée extemporanément à 4 % dans de l'eau minérale. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les lames ont été rincées à l'eau courante puis à l'eau ultra-pure. Les lames ont enfin été montées dans l'Eukitt après séchage à l'air libre.

Analyse

Les lames ont été codées, puis lues à l'aveugle selon les recommandations établies par Fenech *et al.* (Fenech *et al.*, 2003). Les micronoyaux ont été dénombrés pour 1 000 cellules mononucléées par lame, à raison de deux lames par condition. Les résultats sont obtenus à partir de deux expériences indépendantes, et exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3].

4.12. Activité télomérase *

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.

Protocole

L'activité télomérase a été mesurée dans des cellules BEAS-2B exposées 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.

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans du tampon de lyse CHAPS (200 µL / 10⁶ cellules). Après 30 min d'incubation sur la glace, les tubes ont été centrifugés à 12 000 g pendant 20 min (4°C), le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et le culot, contenant les débris cellulaires, a été éliminé. La quantité de protéines a ensuite été dosée 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 *7500 Fast* 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 :
 - o 15 s à 94°C (dénaturation)
 - o 1 min à 59°C (hybridation-élongation)
 - o 10 s à 45°C (collecte des données)

Analyse

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 quatre réplicats biologiques.

4.13. Méthylation de l'ADN *

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 II.10). 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.

Protocole

L'évaluation de la méthylation des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT* a été réalisée dans les cellules BEAS-2B exposées 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 adaptant le protocole initialement décrit par Herman *et al.* (Herman *et al.*, 1996).

L'ADNg des cellules a été extrait sur colonne en utilisant le kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Courtabœuf, France), selon le protocole du fournisseur. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 200 µL de PBS, auxquels ont été ajoutés 20 µL de protéinase K ainsi que 200 µL de tampon *AL*. Après 10 min d'incubation à 56°C, 200 µL d'éthanol absolu ont été ajoutés à la suspension afin de précipiter les acides nucléiques. La suspension a ensuite été transférée sur la colonne, qui a été centrifugée à 6 000 g pendant 1 min, afin d'éliminer le liquide tout en conservant l'ADN fixé à la membrane de silice. L'ADN a ensuite été lavé grâce à 500 µL des tampons *AW1* puis *AW2*, éliminés par centrifugation (6 000 g, 1 min ; puis 20 000 g, 3 min). L'ADN a enfin été élué 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 en mélangeant 45 µL de solution d'ADN à 5 µL de *Denaturation Reagent*, puis en incubant cette suspension pendant 10 min à 50°C. La conversion a ensuite été obtenue en transférant la suspension dans une microplaque 96 puits, puis en ajoutant 100 µL de *Conversion Reagent* à chaque échantillon et en appliquant le protocole de température suivant 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.

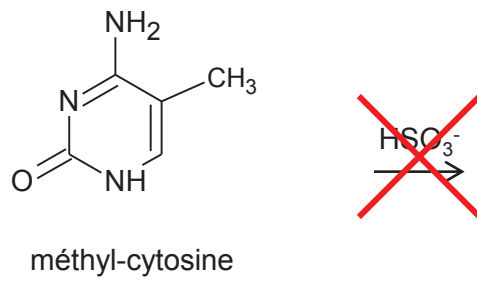
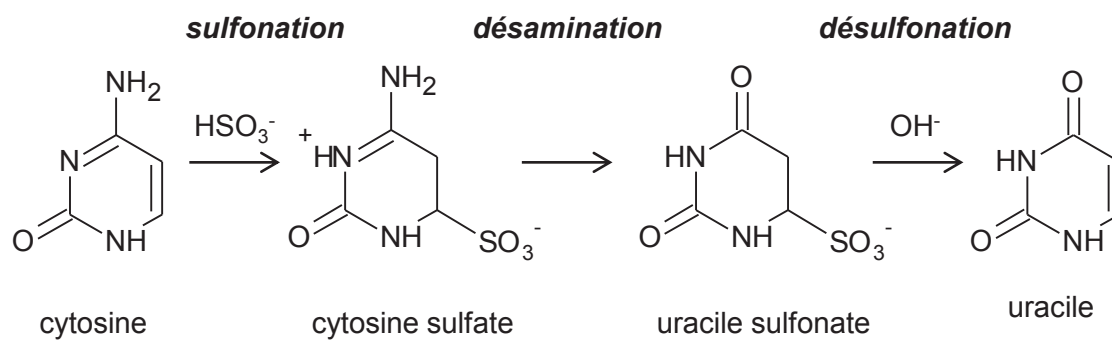


Figure 1.1.1 Réaction de conversion au bisulfite.

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

- ajout de 600 μ L de *Binding Buffer* dans la colonne
- ajout de l'échantillon converti
- centrifugation 10 000 g, 1 min
- lavage par 600 μ L de *Wash Buffer*
- centrifugation 10 000 g, 1 min
- désulfonation par ajout de 200 μ L de *Desulfonation Reagent* et incubation 15 min à température ambiante
- centrifugation 10 000 g, 1 min
- lavage par 400 μ L de *Wash Buffer*
- centrifugation 10 000 g, 1min x 2
- élution par 40 μ L 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 *μ Drop* 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 μ L d'ADN dilué ont été ajoutés à 18 μ L du mélange réactionnel suivant :

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

Le protocole de PCR a été adapté en fonction de la cible (Tableau II.3). 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.

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*. La méthodologie employée pour la comparaison des échantillons est similaire à celle utilisée pour étudier les niveaux d'expression des EMX :

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

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

Préfixe	Séquences Sens / AntiSens	Temp. hy.	Temp. acq.	Conc.	Cycles	Réf. 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	84°C	200 nM	45	<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	200 nM	40	<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	76°C	200 nM	40	<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	200 nM	40	<i>DiVinci et al., 2006</i>

Tableau 3 Amorces et conditions de PCR utilisées.
M : Méthylé ; UnM : Non-méthylé ; S : Sens ; AS : anti-sens

4.14. Modifications post-traductionnelles d'histones *

Principe

Les histones peuvent être la cible de différentes modifications post-traductionnelles, telles que des acétylations ou des méthylations. Il existe des anticorps spécifiques des formes modifiées, qui peuvent être détectés par *Western-Blot*. Il est ainsi possible, en mesurant dans un même échantillon les quantités d'histones modifiées et totales, de calculer un taux de modification et de comparer différentes conditions.

Protocole

Deux types de modifications post-traductionnelles de l'histone H3 ont été mesurés, à savoir l'acétylation de la lysine 18 (H3K18ac) et la diméthylation de la lysine 4 (H3K4me2), dans des cellules BEAS-2B exposées 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.

La récupération des cellules a été faite telle que décrit précédemment, avec l'ajout d'une étape de rinçage au PBS - butyrate de sodium 5 mM, afin de maintenir le niveau d'acétylation des histones.

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans du Triton Extraction Buffer (TEB) constitué de PBS, 0,5 % (v/v) de Triton-X100, PMSF 2 mM et NaN₃ 0,02 % (m/v). Les cellules ont été lysées par 10 min d'incubation sur la glace dans le TEB sous agitation légère, puis centrifugées pendant 10 min à 300 g (4°C). Les culots cellulaires contenant les noyaux ont été remis en suspension dans du TEB et centrifugés comme précédemment. Après élimination du surnageant, les culots ont été resuspendus dans de l'HCl 0,2 N, puis incubés sur la nuit à 4°C afin de précipiter les histones. Après une nouvelle centrifugation, les culots ont été resuspendus dans de l'eau ultra-pure, puis les protéines dosées par méthode BCA.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse, sur des gels de polyacrylamide 10 % (10 x 10 cm, 1 mm d'épaisseur, 12 pistes), préparés à partir de :

- 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mM (pH 8,7)
- 2,5 mL d'acrylamide 40 %
- 650 µL de bis-acrylamide 2 %
- 100 µL d'ammonium persulfate 10 %
- 100 µL de SDS
- 4,14 mL d'eau ultra-pure
- 10 µL de TEMED.

Après polymérisation, un gel de compression à 7% a été coulé au dessus du gel de migration. Il a été obtenu en mélangeant :

- 833 μ L de Tris-HCl 0,5 mM (pH 6,8)
- 583 μ L d'acrylamide 40 %
- 267 μ L de bis-acrylamide 2 %
- 33 μ L d'ammonium persulfate 10 %
- 33 μ L de SDS
- 1,58 mL d'eau ultra-pure
- 10 μ L de TEMED.

Les échantillons ont été dilués dans l'eau ultra-pure afin d'obtenir des concentrations en protéines homogènes entre les différentes pistes. Ces solutions ont ensuite été diluées au demi (20 μ L final) dans du tampon de charge (0,3 g dithiothréitol ; 4 mL SDS 10% ; 3,2 mL Tris-HCl 0,5 M ; 2,5 g glycérol 87 % ; 0,5 mg Bleu de Bromophénol ; eau-ultra pure *qsp* 20 mL ; pH 6,8). Le mélange a ensuite été chauffé à 95°C pendant 5 min, afin de dénaturer les protéines, avant d'être déposé sur le gel. De part et d'autre des échantillons, un marqueur de taille coloré (Novex[®]) et un marqueur biotinylé ont été déposés, afin de suivre la migration des protéines et de déterminer le poids moléculaire des bandes obtenues. Un puits contenant de l'histone 3 recombinante non-modifiée, diluée au 1/64^{ème} a également été ajouté, afin de contrôler la spécificité des anticorps anti-histone 3 modifiée.

L'électrophorèse a été effectuée pendant 90 min à 125 V, dans un tampon de migration (3 g Tris-base ; 14,4 g glycine ; eau ultra-pure *qsp* 1 L ; pH 8,3) auquel a été ajouté extemporanément 1 % (m/v) de SDS.

A la fin de la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Hybond[®]) préalablement activée au méthanol (30 s) puis équilibrée pendant 20 min dans du tampon de transfert (14,4 g glycine ; 6,04 g Tris-base ; eau ultra-pure *qsp* 1 L) auquel 10 % de méthanol a été ajouté extemporanément. Le système de transfert a été assemblé dans l'ordre suivant :

- éponge de 6mm d'épaisseur
- papier Whatman préalablement imbibé de tampon de transfert
- gel
- membrane PVDF activée et équilibrée
- papier Whatman préalablement imbibé de tampon de transfert
- éponge de 3 mm d'épaisseur.

Le transfert des protéines a été réalisé à 80 mA sur la nuit dans une cuve contenant le tampon décrit précédemment et munie d'un système de refroidissement.

La qualité du transfert a été évaluée en vérifiant l'absence de protéines résiduelles dans le gel, par une coloration au bleu de Coomassie. Pour ce faire, le gel a été incubé pendant 2 h à température ambiante et sous agitation dans une solution contenant 40 % d'eau ultra-pure, 10 % d'acide acétique glacial, 50 % de méthanol (v/v), ainsi que 0,25 % (m/v) de Bleu de Coomassie. Le gel a ensuite été décoloré progressivement dans le mélange eau/acide acétique/méthanol (4/1/5, v/v), en vérifiant l'absence de bande.

La détection des cibles d'intérêt a été réalisée en utilisant le système *Snap i.d.* (Merck-Millipore), qui permet de réduire les temps d'incubation et les quantités d'anticorps utilisés par un système de pompe à vide. L'ensemble des étapes d'hybridation (blocage, incubations, rinçages) a été réalisé selon les recommandations du manuel d'utilisation. La membrane a tout d'abord été bloquée à l'aide du tampon de blocage fourni dans le kit *ECL Advance* (GE Healthcare) dilué à 0,5 % (m/v) dans du tampon TBS-Tween (2,42 g Tris-HCl ; 8 g NaCl ; eau ultra-pure *qsp* 1 L ; pH 7,6 ; 1 mL Tween-20). La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire anti-H3K18c, rincée, incubée avec le mélange d'anticorps secondaires (anti-lapin et anti-biotine) puis rincée de nouveau. Les caractéristiques des anticorps utilisés sont résumées dans le Tableau II.4.

La révélation a été faite par chimioluminescence, après 5 min d'incubation de la membrane dans le noir avec le réactif du kit *ECL Advance*, grâce au système *G:BOX* (Syngene Europe, Cambridge, Royaume-Uni). Les images obtenues ont été enregistrées afin de permettre leur traitement ultérieur.

Après la révélation, les anticorps fixés sur la membrane ont été éliminés (désybridation) par deux incubations successives de 10 min dans du tampon de *stripping* pH 2,2 (1,5 g glycine ; 0,1 g SDS ; 1 mL Tween-20 ; eau ultra-pure *qsp* 100 mL). La membrane a ensuite été rincée par trempage pendant 10 min dans du PBS, puis dans le *Snap i.d* 1 fois au PBS et trois fois au TBS-Tween.

Elle a ensuite été hybridée de nouveau comme décrit ci-dessus, en remplaçant l'anticorps anti-H3K18ac par l'anticorps anti-H3K4me2. La procédure de désybridation a été répétée tel que précédemment, puis la membrane ré-hybridée avec l'anticorps anti-H3, qui détecte la protéine indépendamment de toute modification.

Analyse

Les images acquises ont été traitées avec le logiciel *GeneTools* (Syngene), afin de quantifier les bandes présentes dans chacune des pistes.

Anticorps	Utilisation	Type	Source	Dilution
H3K18ac	Ab primaire	IgG polyclonale	lapin	1/1000
H3K4me2	Ab primaire	IgG monoclonale	lapin	1/5000
Histone 3	Ab primaire	IgG polyclonale	lapin	1/1000
Lapin	Ab secondaire	couplé HRP	chèvre	1/2000
Biotine	Ab secondaire	couplé HRP	chèvre	1/1000

Tableau 4 Anticorps utilisés pour les expériences de *Western-Blot*.
Ab : Anticorps ; *IgG* : Immunoglobuline de type G ; *HRP* : HorseRaddish Peroxidase.

Le poids moléculaire des bandes obtenues a été vérifié (17 kDa) grâce au marqueur biotinylé. L'absence de signal dans la piste correspondant à l'histone 3 recombinante lors des hybridations avec les anticorps anti-H3K18ac et anti-H3K4me2 a également été vérifiée.

Pour chaque piste, le rapport H3 modifié / H3 total a été calculé. Le ratio obtenu pour chaque échantillon exposé a ensuite été rapporté à celui obtenu dans les cellules non-exposées étudiées sur le même gel. Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

4.15. miRNA

Principe

La quantification des miRNA repose sur des principes similaires à ceux utilisés en RT-qPCR classique. Il est tout d'abord nécessaire d'extraire les miRNA, qui sont ensuite rétro-transcrits en ADNc, avant d'être amplifié par PCR. L'amplification est visualisée en temps réel grâce à l'ajout de *Sybr Green*. Quelques adaptations sont cependant nécessaires. Il est tout d'abord indispensable d'ajouter une queue polyA aux miRNA avant de procéder à la rétro-transcription. Le choix des amorces est également différent :

- l'une des amorces est constituée de la séquence complète du miRNA
- l'autre amorce est une amorce universelle, utilisée quelle que soit la cible.

Protocole

Le niveau d'expression de miR-21, miR-26b et miR-27a, ainsi que de RNU-6B (référence interne) a été évalué dans les cellules BEAS-2B exposées 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.

L'extraction des miRNA a été réalisée grâce au kit *miRNeasy Mini* (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été lysées en resuspendant le culot dans 700 µL de *QIAzol Lysis Reagent*. Après 5 min d'incubation à température ambiante, les ARN totaux ont été extraits en ajoutant 140 µL de chloroforme, puis en agitant fortement et en laissant les tubes reposer les tubes 3 min à température ambiante avant de les centrifuger (12 000 g, 15 min, 4°C) pour permettre la séparation des phases. La phase aqueuse (supérieure), contenant les ARN, a ensuite été récupérée puis mélangée à 500 µL d'éthanol absolu. Le mélange a été transféré sur colonne, pour permettre la purification des ARN. Après une première centrifugation (8 000 g, 15 s), les ARN ont été lavés à l'aide de 700 µL de tampon *RWT*, puis deux fois avec 500 µL de tampon *RPE* en incluant des centrifugations

intermédiaires (2 fois 8 000 g, 15 s ; puis 8 000 g, 2 min). Les ARN ont enfin été élués dans 40 µL d'eau ultra-pure, grâce à une centrifugation de 1 min à 8 000 g.

Les étapes de polyadénylation et de rétro-transcription ont été réalisées simultanément grâce au kit *NCode VILO miRNA cDNA Synthesis* (Life Technologies), en mélangeant :

- 2 µL de la solution d'ARN précédemment extraite ou d'eau ultra-pure (contrôle)
- 2 µL de *Reaction Mix 5X*, contenant la polyA polymérase
- 1 µL de *SuperScript® Enzyme Mix 10X*
- 5 µL d'eau ultra-pure.

Les réactions ont été réalisées en utilisant le thermocycleur *7500 Fast* programmé comme suit :

- 60 min à 37°C (polyadénylation et rétro-transcription)
- 5 min à 95°C (inactivation)
- maintien à 4°C.

Les produits de RT ont ensuite été dilués au 1/20^{ème} puis répartis sur différentes plaques pour procéder aux PCR.

La PCR a été réalisée en utilisant le kit *Express Sybr GreenER miRNA qRT-PCR* (Life Technologies), à partir de 1 µL d'ADNc (échantillons ou contrôle de RT) ou d'eau ultra-pure (contrôle négatif de PCR) auxquels ont été ajoutés 9 µL de mélange réactionnel contenant :

- 5 µL d'*Express Sybr® GreenER™ qPCR SuperMix Universal 2X*
- 1 µL d'amorce spécifique du miRNA (Tableau II.5)
- 0,2 µL d'amorce universelle (200 nM final)
- 0,02 µL de *ROX Reference Dye*
- 3,8 µL d'eau ultra-pure.

La PCR a été réalisée sur le même appareil que la RT, configuré en mode « *Fast* », selon le protocole suivant :

- 20 s à 95°C (activation de la Taq polymérase)
- 40 cycles d'amplification :
 - o 1 s à 95°C (dénaturation)
 - o 20 s à 60°C (hybridation-élongation & collecte des données).
- montée progressive en température (1°C / min), 60 °C - 95°C (courbe de fusion).

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*. La

miRNA	Séquence
miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA
miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGT
miR-27a	TTCACAGTGGCTAAGTTCCGC
RNU-6B	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT

Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour la quantification des miRNA, issues de la base de données miR-Base (Griffith-Jones *et al.*, 2006).

méthodologie employée pour la comparaison des échantillons est similaires à celle utilisé précédemment, en remplaçant l'ARN 18S par RNU-6B :

$$\Delta Ct_{\text{échantillon}} = Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{RNU-6B}}$$
$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ avec } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{exposition}} - \Delta Ct_{\text{cellules_non-exposées}}$$

Les résultats sont exprimés sous la forme médiane [Q1;Q3] de quatre réplicats biologiques.

4.16. Analyses statistiques

4.16.1. Logiciels utilisés

Le logiciel Microsoft Excel 2007 a été utilisé pour :

- les calculs de médianes et quartiles
- l'analyse de régression (YG1041)
- la modélisation des résultats de cytotoxicité (complément XLSTATS)
- les tests du χ^2 (micronoyaux)
- les calculs de RQ
- les représentations graphiques.

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

- les tests de normalité
- l'analyse du test des comètes (ANOVA + Bonferroni)

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

- les tests U de Mann-Whitney
- l'analyse du test d'Ames.

4.16.2. 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.

Deux paramètres ont cependant pu être décrits grâce aux moyennes et écart-types, après avoir démontré par des tests de normalité que leur distribution suivait une loi normale. Il s'agit des résultats du test d'Ames et du test des comètes, en considérant pour ce dernier chaque cellule individuellement et en utilisant comme paramètre le logarithme du pourcentage d'ADN dans la queue de comètes.

4.16.3. 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.

Une exception a été faite pour l'analyse du test des micronoyaux, où un test du χ^2 a été utilisé pour comparer deux fréquences (nombre de micronoyaux pour 1 000 cellules mononucléées selon les conditions).

Les deux paramètres suivant une loi normale ont quant à eux fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA), associée à un post-hoc adapté :

- test de Dunnett, adapté à l'étude des relations dose-réponse (test d'Ames)
- test de Bonferroni, pour les comparaisons multiples (test des comètes)

Dans tous les cas, quatre types de comparaison ont été effectués :

- une comparaison aux cellules non-exposées, pour toutes les conditions :

$$H_0 : \text{exposés} = \text{témoins}$$

- une comparaison des doses, par campagne et par site :

$$H_0 : 3,75 \mu\text{g} / \text{cm}^2 = 15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$$

- des comparaisons entre sites, par campagne et par concentration :

$$H_0 : \text{Industriel} = \text{Urbain}$$

$$H_0 : \text{Industriel} = \text{Rural}$$

$$H_0 : \text{Urbain} = \text{Rural}$$

- une comparaison entre campagnes, par site et par concentration :

$$H_0 : \text{printemps-été} = \text{automne-hiver.}$$

Les corrélations entre les différents paramètres, puis entre les paramètres et les composés contenus dans les $\text{PM}_{2.5}$ ont été évaluées de manière non-paramétrique à l'aide de rho de Spearman.

Pour l'ensemble de ces tests, les degrés de significativité seront exprimés comme suit :

- a : $p < 0,05$
- b : $p < 0,01$
- c : $p < 0,001$
- t : tendance, $p < 0,1$.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. NOTATION DES ÉCHANTILLONS DE PM_{2.5}

Afin de faciliter la lecture, une notation abrégée est adoptée pour désigner chacun des six échantillons atmosphériques reprenant tout d'abord la campagne de prélèvement soit (1) pour la campagne printemps-été 2008 et (2) pour la campagne automne-hiver 2008-2009. La lettre associée désigne le site de prélèvement, à savoir (I) pour le site influencé par la zone industrielle, (U) pour le site sous influence urbaine et (R) sous influence rurale. Le deuxième chiffre désigne la concentration utilisée, soit (1) pour 3,75 µg / cm² et (2) pour 15 µg / cm². Cette notation est associée à un code couleur : Industriel = Orange ; Urbain = Bleu ; Rural = Vert. Ces codes sont récapitulés dans le Tableau III.1, ainsi que dans la liste des abréviations.

Campagne	Site	Concentration	Notation
Printemps-Été 2008 (1)	Industriel (I)	3,75 µg / cm ²	I1
		15 µg / cm ²	I2
	Urbain (U)	3,75 µg / cm ²	U1
		15 µg / cm ²	U2
	Rural (R)	3,75 µg / cm ²	R1
		15 µg / cm ²	R2
Automne-Hiver 2008-2009 (2)	Industriel (I2)	3,75 µg / cm ²	I21
		15 µg / cm ²	I22
	Urbain (U2)	3,75 µg / cm ²	U21
		15 µg / cm ²	U22
	Rural (R2)	3,75 µg / cm ²	R21
		15 µg / cm ²	R22

Tableau III.1 : Notation des échantillons de PM_{2.5}.

2. CARACTERISATION DE LA FRACTION BIOLOGIQUE

Afin de compléter la caractérisation chimique des échantillons de $PM_{2.5}$, nous avons caractérisé la fraction biologique des particules collectées, paramètre souvent négligé mais pourtant pertinent d'un point de vue toxicologique dans le cadre d'une exposition réelle.

Nous avons mis en évidence la présence de nombreux contaminants bactériens (Figure III.1) et fongiques (Figure III.2) viables dans chacun des échantillons de $PM_{2.5}$ collectés.

2.1. Contaminants bactériens

Sur l'ensemble de nos échantillons, les nombres d'unités bactériennes formant des colonies (Colony Forming Units, CFU) sont compris entre 36 CFU / mg $PM_{2.5}$ (2R) et 96 CFU / mg $PM_{2.5}$ (1R) (Tableau III.2). De manière générale, les valeurs observées sont supérieures dans les $PM_{2.5}$ collectées au cours de la saison printemps-été, par rapport aux échantillons de la saison automne-hiver. La différence la plus importante est mise en évidence entre les échantillons ruraux (96 vs 36 CFU / mg $PM_{2.5}$). Il convient cependant de noter que les CFU / mg de $PM_{2.5}$ sont identiques entre les deux saisons dans les échantillons urbains.

	Industriel		Urbain		Rural	
	□□□	□□□ mg	□□□	□□□ mg	□□□	□□□ mg
Printemps-Été	135	77	142	89	168	96
Automne-Hiver	88	58	129	88	51	36

Tableau III.2 : Dénombrement des colonies bactériennes dans les échantillons de $PM_{2.5}$.

Les genres principalement retrouvés sont *Chryseobacterium*, *Bacillus* et *Rhodococcus* dans les $PM_{2.5}$ collectées en printemps-été, alors que les genres *Bacillus* et *Lactobacillus* sont majoritaires dans les particules automne-hiver. A ces genres prépondérants s'ajoutent plus de 10 autres genres (non-identifiés) par boîte.

2.2. Contaminants fongiques

Les échantillons de $PM_{2.5}$ sont également riches en contaminants fongiques viables, avec des valeurs de CFU / mg de $PM_{2.5}$ comprises entre 20 et 117 (Tableau III.3). Tout comme les

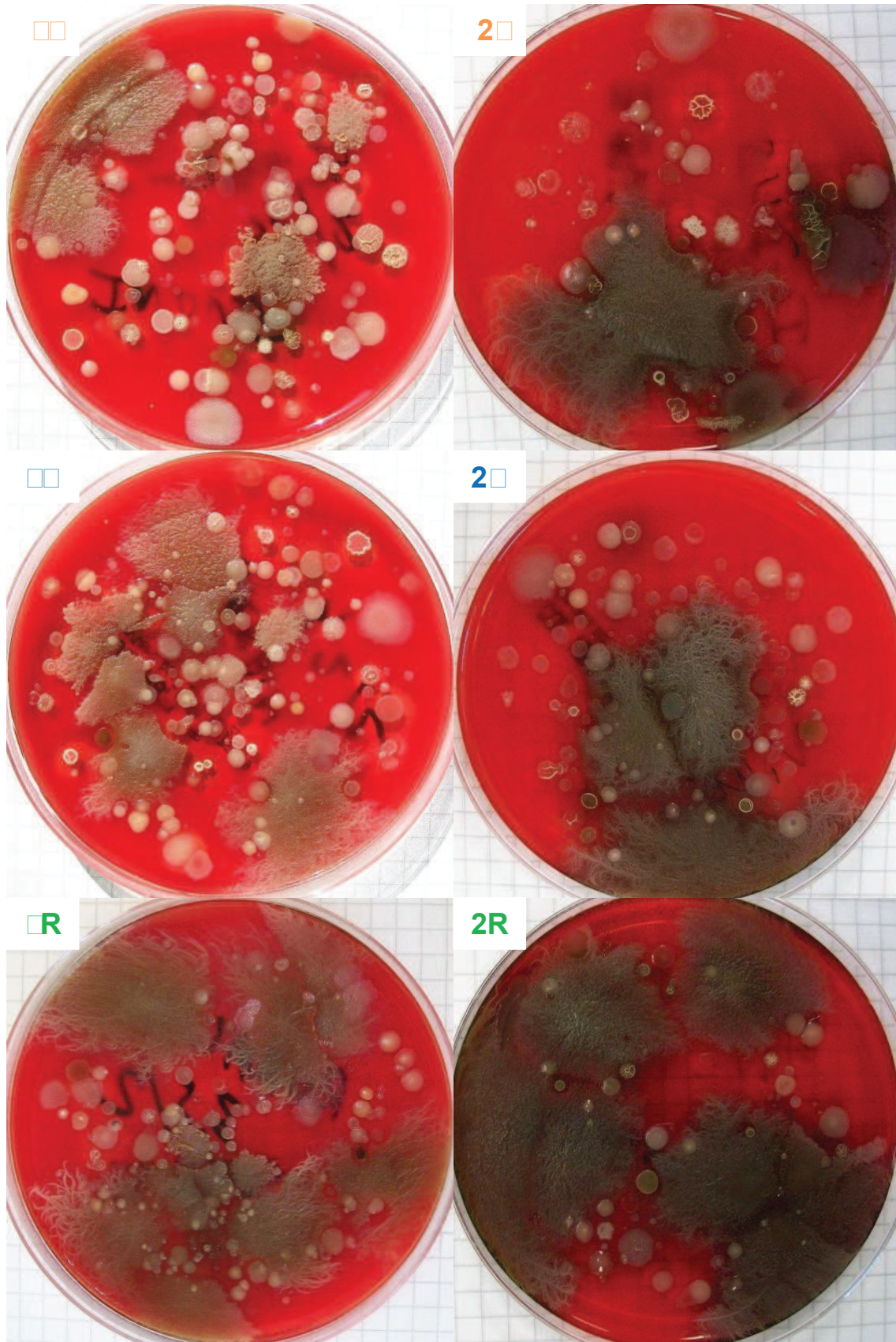


Figure 1 Photographies des cultures bactériennesensemencées avec 1 à 2 mg de $PM_{2.5}$, après 48 h d'incubation à 25°C en conditions aérobie.

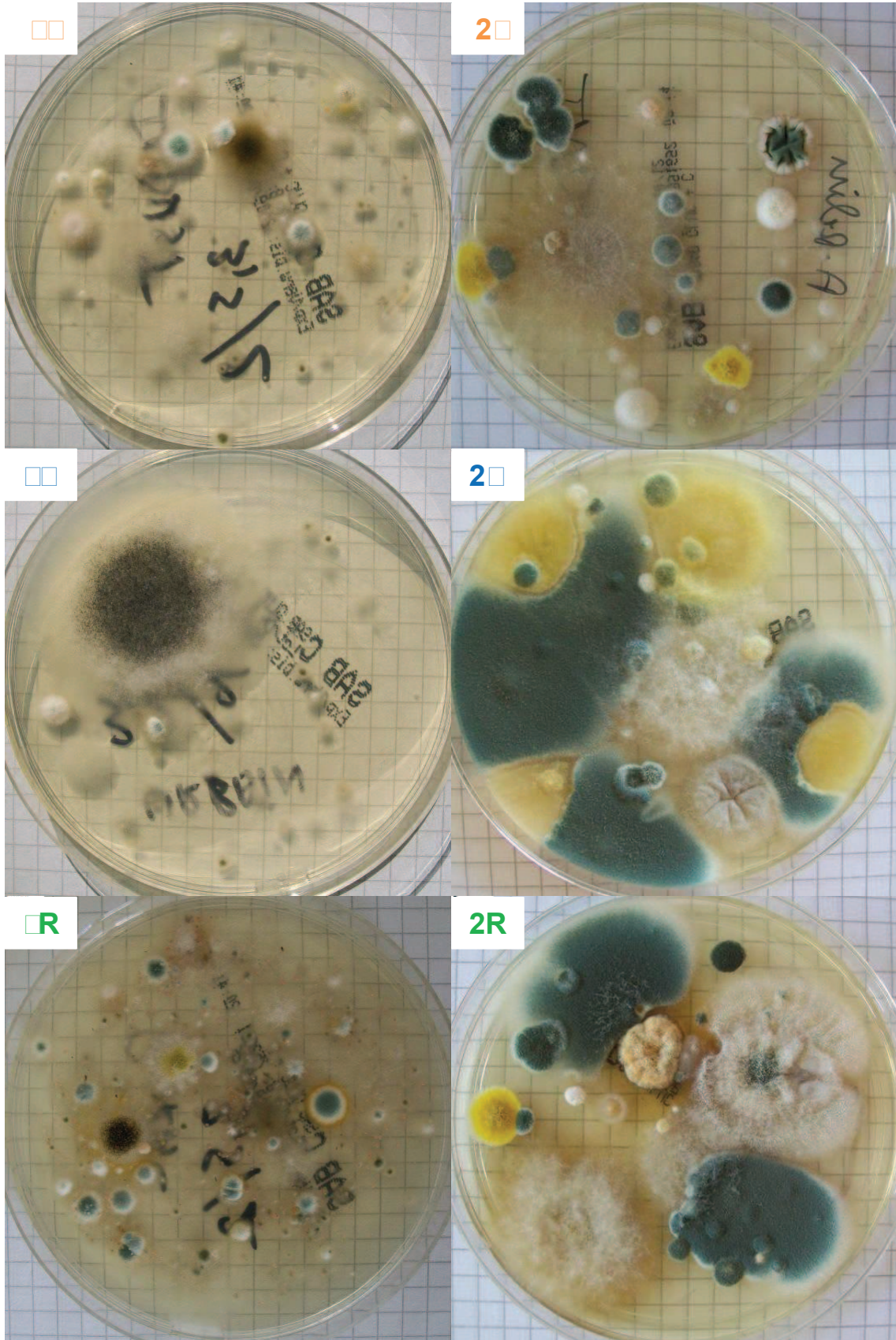


Figure 2 Photographies des cultures fongiquesensemencées avec 1 à 2 mg de $PM_{2.5}$, après 72 h d'incubation à 25°C en conditions aérobies.

bactéries, les champignons sont plus nombreux dans les échantillons printemps-été d'origine industrielle et rurale, que dans les échantillons automne-hiver de la même origine. L'échantillon 1R est particulièrement riche en contaminants fongiques, auxquels s'ajoutent 173 colonies de levures / mg de PM_{2.5}. Comme précédemment, les valeurs obtenues pour les échantillons 1U et 2U sont identiques.

	Industriel		Rural		Rural	
	CFU	CFU / mg	CFU	CFU / mg	CFU	CFU / mg
Printemps-Été	105	60	38	24	205	117
Automne-Hiver	54	36	38	26	29	20

Tableau III.3 : Dénombrement des colonies fongiques dans les échantillons de PM_{2.5}.

Des colonies appartenant aux genres *Penicillium*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Alternaria* sont présentes dans des proportions variables dans les échantillons printemps-été (Tableau III.4). Les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium* et *Mucor* sont quant à eux retrouvés dans les échantillons automne-hiver.

Genre (%)	Printemps-Eté			Automne-Hiver		
	Industriel	Rural	Rural	Industriel	Rural	Rural
<i>Penicillium</i>	18 %	32 %	11 %		3 %	14 %
<i>Aspergillus</i>	3 %	5 %	2 %	20 %	18 %	24 %
<i>Absidia</i>	3 %	5 %	3 %			
<i>Cladosporium</i>	10 %	29 %	15 %			
<i>Alternaria</i>	1 %					
<i>Acremonium</i>				2 %	3 %	7 %
<i>Mucor</i>					11 %	3 %
Autre	65 %	29 %	69 %	78 %	65 %	52 %

Tableau III.4 : Genres fongiques identifiés dans les échantillons de PM_{2.5}.

2.3. Discussion

L'étude de la fraction biologique des différents aérosols collectés met en évidence la présence de nombreux contaminants bactériens et fongiques. Bien que la caractérisation obtenue reste, pour des raisons techniques, assez générale, elle permet de révéler la richesse des différents aérosols, tant au niveau du nombre de microorganismes que de leur diversité. Les résultats obtenus au cours de cette analyse sont cohérents avec d'autres études ayant mis en évidence la présence des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* et *Cladosporium* dans l'air extérieur (Ilanovici and Tudorica, 2009; Li and Kendrick, 1995). Parmi les genres détectés, *Penicillium* et *Aspergillus* sont connus comme étant des agents

capables de provoquer un asthme bronchique (Shen and Han, 1998). Ils peuvent également induire, tout comme le genre *Alternaria*, une alvéolite allergique (Greenberger, 2004). En plus de ces effets, la fraction biologique pourrait jouer un rôle dans la toxicité des particules fines en stimulant les macrophages alvéolaires par l'intermédiaire de différents récepteurs de type Toll-like, provoquant ainsi la libération de cytokines (Becker *et al.*, 2002b, 2005b). L'exacerbation de l'asthme suite à l'inhalation de particules est ainsi majoritairement attribuée aux éléments d'origine biologique (Soukup and Becker, 2001). Cette étude nous a donc permis de révéler la présence de différentes espèces bactériennes et fongiques, qui pourraient accroître les effets toxiques des PM_{2.5} dans le cadre d'une exposition réelle.

Il est toutefois important de signaler que nous n'avons pu prendre en compte la toxicité de la fraction biologique au cours de l'étude présentée ci-après. En effet, les capacités de prolifération des microorganismes dans un milieu riche tel que celui utilisé sont très largement supérieures à celles des cellules humaines cultivées, obligeant ainsi à l'utilisation d'antibiotiques et de fongicides. Nous avons donc concentré notre étude sur l'influence des caractéristiques physico-chimiques des PM_{2.5}, et en particulier de leur composition, sur leur toxicité.

3. MUTAGENICITE DES PM_{2.5}

Etant particulièrement intéressés à l'implication potentielle des PM_{2.5} dans la cancérogénèse broncho-pulmonaire, nous avons commencé notre étude par une évaluation de la mutagénicité intrinsèque des PM_{2.5}.

Pour ce faire, nous avons étudié par test d'Ames chacun des six échantillons de PM_{2.5} à une dose de 5 ; 25 et 50 µg / boîte, sur trois souches de *Salmonella typhimurium* (TA102, TA98 et YG1041), en l'absence ou en présence d'activation métabolique par la fraction S9 de microsomes hépatiques de rats induits à l'Aroclor-1254 (Tableau III.5).

		TA102	TA98	YG1041	
Printemps-Eté	industriel	-S9	33 □ □ □ □ 3	1,05 ± 0,07	255 □ □ □ 35
		+S9	34 □ □ □ □ 5	1,24 ± 0,12	5 □ □ □ □ 2
	rural	-S9	25 □ □ □ □ 7	56 □ □ □ □ 4	33 □ □ □ □ 6
		+S9	52 □ □ □ □ 5	1,25 ± 0,17	4 □ □ □ □ 24
	Rural	-S9	1,24 ± 0,16	2 □ □ □ □ □ 23	4 □ □ □ □ 76
		+S9	37 □ □ □ □ 6	23 □ □ □ 32	6 □ □ □ □ 37
Automne-Hiver	industriel	-S9	2 □ □ □ □ □ □	24 □ □ □ □ 3	466 □ □ □ □ □
		+S9	1,24 ± 0,07	6 □ □ □ 35	7 □ □ □ □ □
	rural	-S9	7 □ □ □ □ □	7 □ □ □ □ 46	5 □ □ □ □ □ 4
		+S9	27 □ □ □ □ 2	76 □ □ □ 53	6 □ □ □ □ □ 72
	Rural	-S9	□ □ □ □ □ □ 3	37 □ □ □ 62	□ □ □ □ □ □ 76
		+S9	2 □ □ □ □ □ □	75 □ □ □ 33	57 □ □ 23

Tableau III.5 : Facteurs d'induction observés pour 50 µg / boîte de PM_{2.5}.
les valeurs en gras indiquent des facteurs d'induction significatifs (ANOVA ; p < 0,05)

3.1. Souche TA102

L'étude réalisée sur la souche TA102 ne permet pas de mettre en évidence d'effet net des PM_{2.5} (Figure III.3). En effet, les facteurs d'induction (FI) calculés après exposition de la souche aux PM_{2.5} à leur dose la plus forte (50 µg / boîte) sont compris entre 1,17 (+/- 0,11) pour l'échantillon 2U (+S9) et 1,52 (+/- 0,15) pour l'échantillon 1U (+S9) (Figure III.3.A,B). Bien que suivant généralement une relation dose-réponse (Figure III.3), cet effet très faible est indépendant de la présence de S9 (P > 0,1 pour toutes les comparaisons). De même, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les échantillons collectés sur les différents sites au cours d'une même campagne, ni entre les deux campagnes pour un même site, hormis pour les échantillons ruraux en présence de S9 (P > 0,1 pour toutes les comparaisons, sauf 1R vs 2R : p < 0,05).

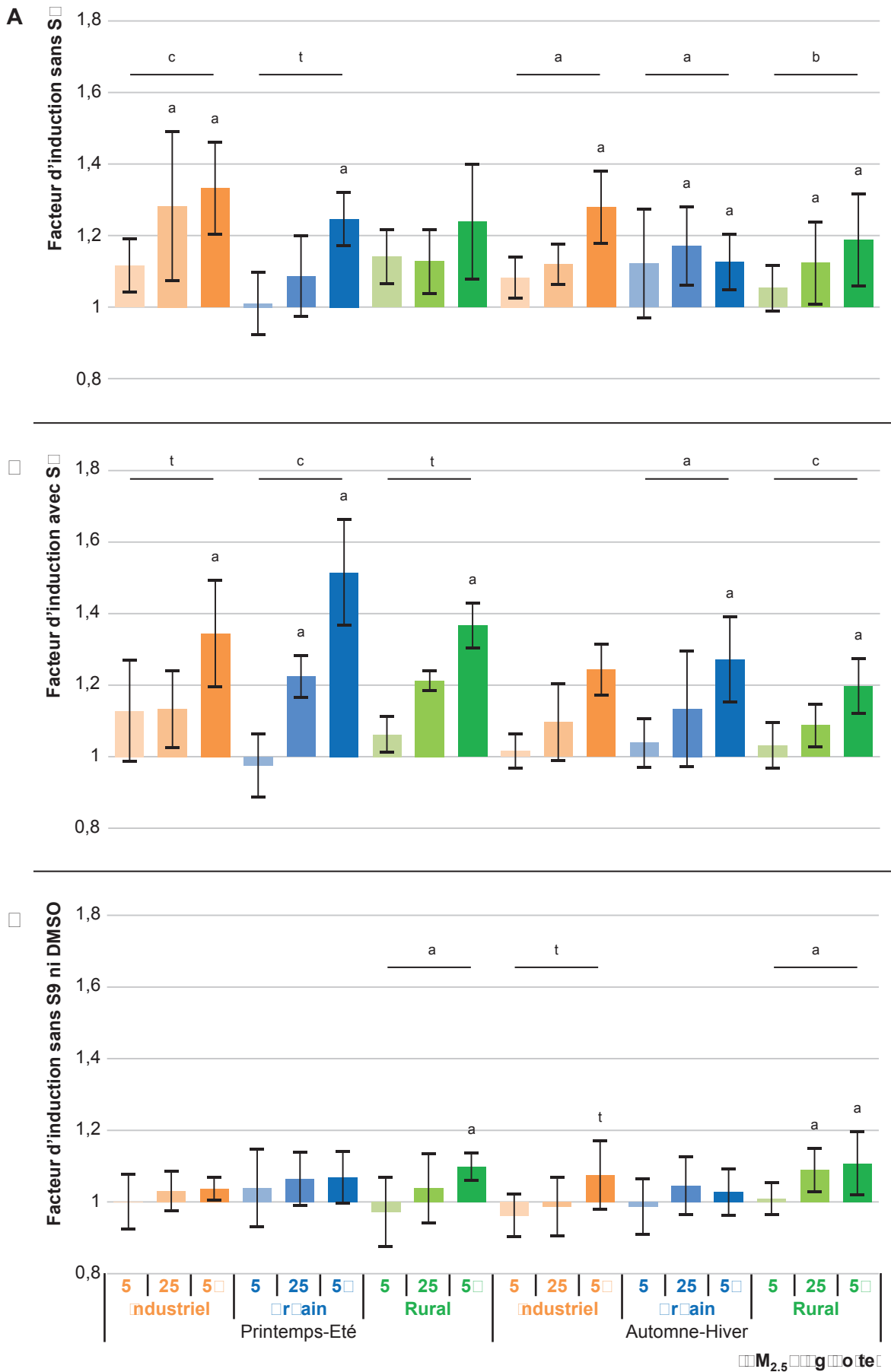


Figure 3 Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche TA102, en absence (A) ou en présence (B) de fraction S9, ainsi qu'en absence de S9 et de DMSO (C), après exposition pendant 48 h aux échantillons de $PM_{2.5}$ à une concentration de 5 ; 25 ou 50 μg / boîte.

Moyenne \pm ET, $n = 2 \times 3$; ANOVA et test de Dunnett
 t : tendance $P < 0,1$; a : $P < 0,05$; c : $P < 0,001$

Etant donné la sensibilité théorique de la souche TA102 aux espèces oxydantes, et vu le niveau de réponse faible et homogène, nous avons répété l'expérience en remplaçant le DMSO, connu pour être un piègeur de radicaux (Grey and Adlercreutz, 2003), par du tampon phosphate pour la remise en suspension des PM_{2.5}. Les facteurs d'inductions obtenus sont alors fortement réduits, avec une valeur maximale de 1,11 (+/- 0,09) pour l'échantillon 2R (Figure III.3.C). Comme en présence de DMSO, il n'existe pas de différence significative entre les PM_{2.5} des différents sites ou saisons d'échantillonnage. Seule une tendance peut être observée entre les échantillons 2U et 2R ($p < 0,1$).

3.2. Souche TA98

Nous avons ensuite testé les six échantillons de PM_{2.5} sur la souche TA98. En absence d'activation métabolique, le nombre de révertants est significativement augmenté après exposition aux échantillons 1R, 2U et 2R dès 5 µg / boîte et à partir de 25 µg / boîte pour les échantillons 1U et 2I ($p < 0,05$). Aucune différence n'est observée après exposition aux PM_{2.5} 1I, quelle que soit la dose (Figure III.4.A). En présence de S9, le facteur d'induction est significativement augmenté après exposition aux échantillons 1R, 2I, 2U et 2R dès 25 µg / boîte ($p < 0,05$), alors qu'aucune variation n'est mise en évidence après exposition aux PM_{2.5} 1I et 1U (Figure III.4.B). Indépendamment de la présence de S9, les facteurs d'induction, lorsqu'ils sont significatifs, suivent une relation dose-réponse ($p < 0,05$ pour l'échantillon 1U -S9 ; $p < 0,001$ pour les PM_{2.5} 1R, 2I, 2R et 2U +/- S9) (Figure III.4).

L'ajout de S9 n'a pas d'effet sur la réponse de la souche TA98. En effet, seule une tendance à l'augmentation a pu être mise en évidence pour l'échantillon 1U ($p < 0,1$). Des différences sont à l'inverse observées entre les échantillons à la dose la plus forte. Les échantillons ruraux ont ainsi un effet mutagène plus marqué que les échantillons industriels pour une campagne donnée, indépendamment de la présence de S9 ($p < 0,05$). L'échantillon 1R a également un effet plus important que l'échantillon 1U (+/- S9), lui-même plus mutagène que l'échantillon 1I en absence de S9 ($p < 0,05$) (Tableau III.6).

A	Rural		Rural	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Intemps Été	-S9	a	b	
	+S9		ns	a
Rural	-S9		a	
	+S9			a

A	Rural		Rural	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Automne Hiver	-S9	ns	a	
	+S9		ns	a
Rural	-S9		ns	
	+S9			ns

Tableau III.6 : Comparaisons intersites de la réponse de la souche TA98 aux PM_{2.5}.
(ANOVA ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$; b : $p < 0,01$)

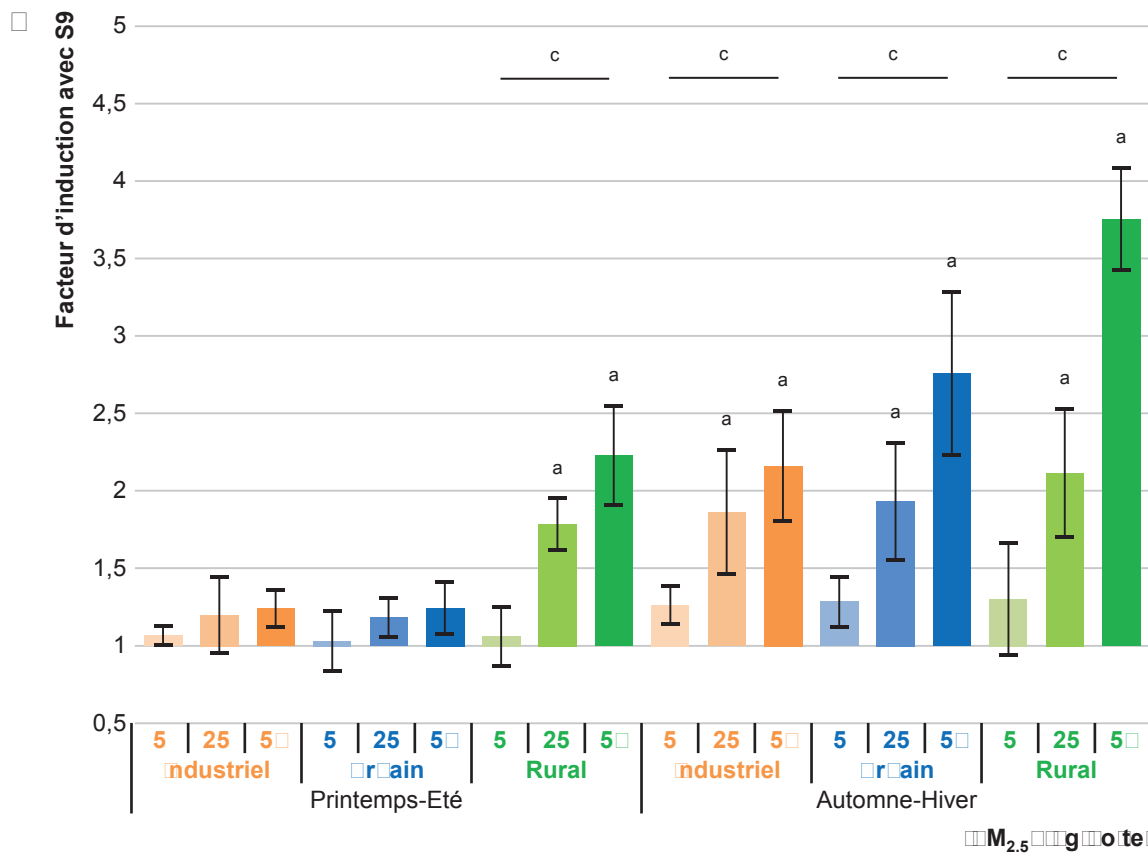
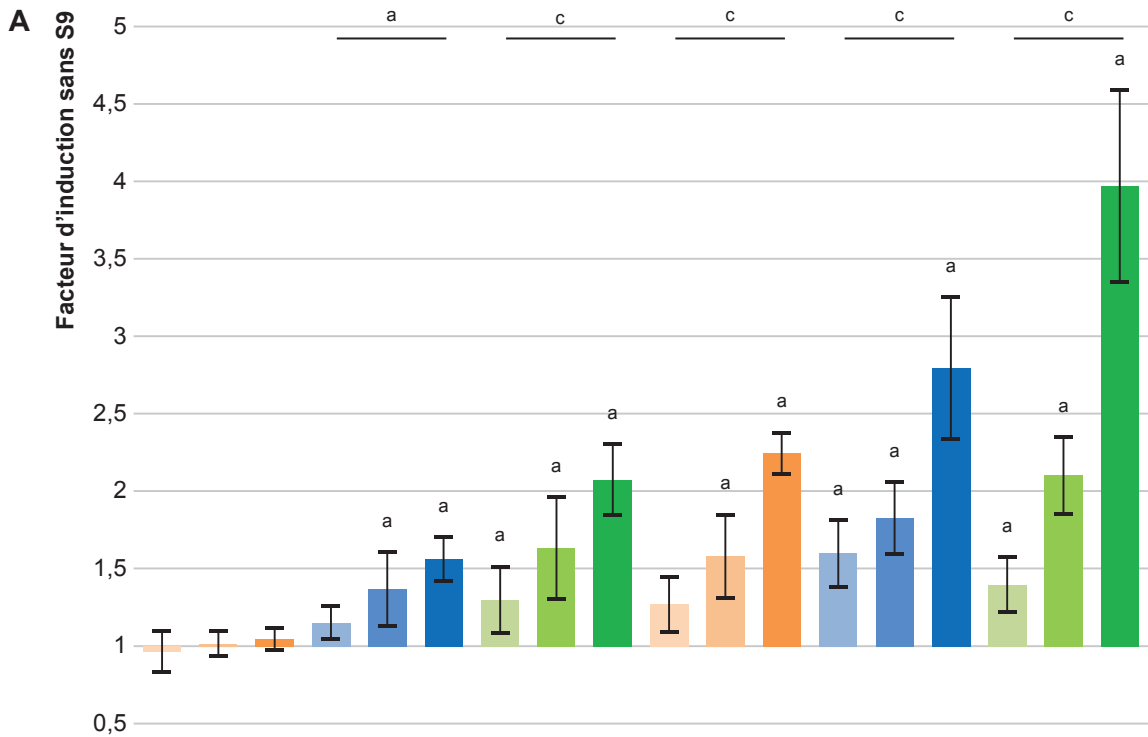


Figure 4 Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche TA98, en absence (A) ou en présence (B) de fraction S9 après exposition pendant 48 h aux échantillons de PM_{2,5} à une concentration de 5 ; 25 ou 50 µg / boîte.
Moyenne ± ET, n = 2 x 3 ; ANOVA et test de Dunnett
a : P < 0,05 ; c : P < 0,001

A ces variations intersites s'ajoutent des différences entre les $PM_{2.5}$ collectées au cours des deux campagnes, pour un même site de prélèvement. Les échantillons prélevés au cours de la saison automne-hiver ont des effets mutagènes plus marqués que les échantillons collectés lors de la campagne printemps-été (tendance $p < 0,1$ pour les conditions I +S9 et U +/- S9 ; $p < 0,05$ pour les conditions R +/- S9 ; $p < 0,001$ pour la condition I -S9).

3.3. Souche YG1041

Nous avons également évalué la mutagénicité des échantillons de $PM_{2.5}$ sur la souche YG1041. Les facteurs d'induction observés sont significatifs pour tous les échantillons de $PM_{2.5}$ à une dose supérieure ou égale à $25 \mu\text{g} / \text{boîte}$ sans activation métabolique (Figure III.5.A). En présence de S9, une réponse significative est obtenue pour l'échantillon 2U dès $5 \mu\text{g} / \text{boîte}$ et pour les échantillons 1U, 1R, 2I et 2R à partir de $25 \mu\text{g} / \text{boîte}$, alors qu'une dose de $50 \mu\text{g} / \text{boîte}$ est nécessaire pour obtenir une réponse significative avec les $PM_{2.5}$ 1I (Figure III.5.B). Les réponses induites par les échantillons de particules suivent systématiquement une relation dose-réponse fortement significative ($p < 0,001$) (Figure III.5).

Pour chaque échantillon de $PM_{2.5}$, nous avons comparé les facteurs d'induction à $50 \mu\text{g} / \text{boîte}$ en l'absence et en présence de S9. Les résultats mettent en évidence une très forte diminution du facteur d'induction après ajout de S9, avec un rapport FI_{-S9}/FI_{+S9} compris entre 1,6 (1I) et 3,2 (1R) (1I et 2R : $p < 0,05$; 1U, 1R et 2U : $p < 0,01$; 2I : $p < 0,001$). En plus de différences liées à la présence de S9 s'ajoutent des variations intersites et intercampagnes. Les facteurs d'induction observés pour les particules d'origine rurale sont systématiquement supérieurs à ceux observés pour les échantillons industriels et urbains de même campagne d'échantillonnage en absence de S9. En présence de S9, les différences sont de moindre amplitude et seules des tendances peuvent être mises en évidence, uniquement entre les échantillons ruraux et industriels ($p < 0,1$). De la même manière, les échantillons urbains induisent globalement des effets plus importants que les particules industrielles, avec comme sans activation métabolique (Tableau III.7).

4	Printemps-Été		Automne-Hiver	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Industriel	-S9	t	b	
	+S9		a	t
Urbain	-S9		b	
	+S9			ns

4	Printemps-Été		Automne-Hiver	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Industriel	-S9		c	b
	+S9		a	t
Urbain	-S9			a
	+S9			ns

Tableau III.7 : Comparaisons intersites de la réponse de la souche YG1041 aux $PM_{2.5}$. (ANOVA ; ns : non-significatif ; t : tendance $p < 0,1$; a : $p < 0,05$; b : $p < 0,01$; c : $p < 0,001$)

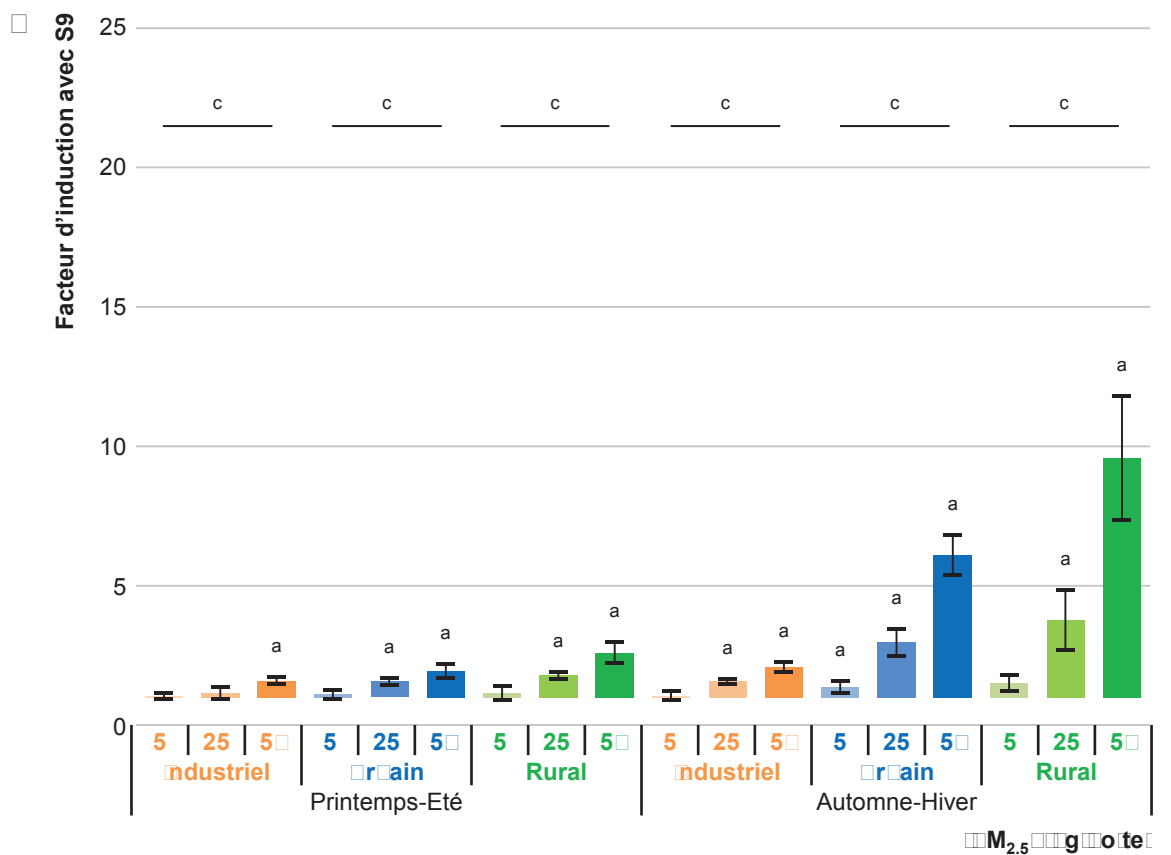
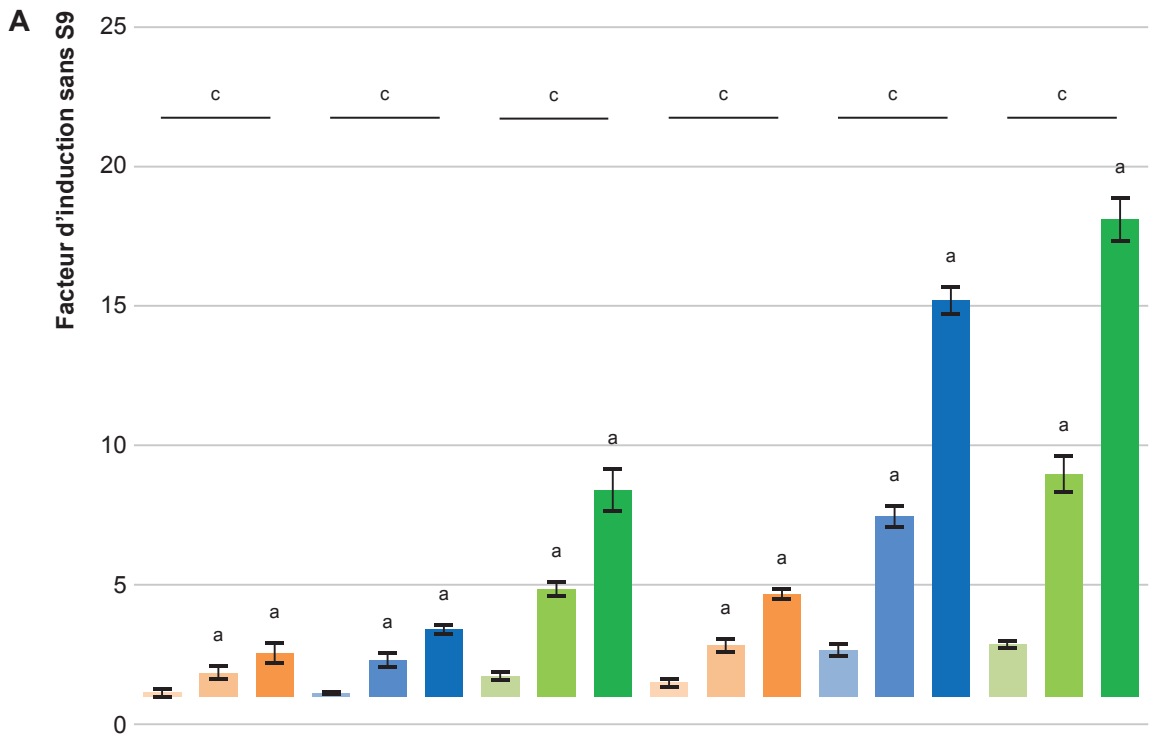


Figure 5 Facteurs d'induction observés en test d'Ames sur la souche YG1041, en absence (A) ou en présence (B) de fraction S9 après exposition pendant 48 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 5 ; 25 ou 50 µg / boîte. Moyenne ± ET, n = 2 x 3 ; ANOVA et test de Dunnett a : P < 0,05 ; c : P < 0,001

Les différences intercampagnes se manifestent, comme pour la souche TA98, par des facteurs d'induction nettement plus élevés après exposition aux particules collectées en saison automne-hiver en comparaison avec les particules printemps-été du même site (Tableau III.8).

Site	-S9		+S9	
	FI _{AH} / FI _{PE}	p	FI _{AH} / FI _{PE}	p
Industriel	1,82	b	1,30	b
Urbain	4,48	c	3,14	a
Rural	2,15	b	3,68	t

Tableau III.8 : Comparaisons intercampagnes de la réponse de la souche YG1041 aux PM_{2.5}.
(ANOVA ; t : tendance p < 0,1 ; a : p < 0,05 ; b : p < 0,01 ; c : p < 0,001)

3.4. Modélisation

Nous avons ensuite testé la linéarité de la relation dose-réponse observée sur la souche YG1041 pour les six échantillons de PM_{2.5}. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode des surfaces de réponses et déterminé les coefficients de la régression linéaire de type :

$$FI = \beta_1 \cdot [PM_{2.5}] + \beta_0$$

Le coefficient directeur de la droite (β_1) représente l'augmentation du facteur d'induction associée à chaque ajout de 1 µg / boîte de PM_{2.5}. Les données obtenues sont résumées dans le Tableau III.9.

Saison	Site	S9	β_0	Intervalle β_0	β_1	Intervalle β_1	R ²	p
			Printemps-Eté	Industriel	-S9	1,00	[0,86;1,14]	0,031
		+S9	0,97	[0,88;1,05]	0,012	+/- 0,003	0,723	c
	Urbain	-S9	0,96	[0,85;1,07]	0,049	+/- 0,004	0,968	c
		+S9	1,02	[0,92;1,12]	0,019	+/- 0,003	0,853	c
	Rural	-S9	1,02	[0,78;1,26]	0,149	+/- 0,009	0,983	c
		+S9	1,00	[0,86;1,13]	0,032	+/- 0,005	0,890	c
Automne-Hiver	Industriel	-S9	1,05	[0,94;1,16]	0,072	+/- 0,004	0,986	c
		+S9	0,98	[0,90;1,07]	0,022	+/- 0,003	0,915	c
	Urbain	-S9	0,99	[0,71;1,27]	0,279	+/- 0,010	0,994	c
		+S9	0,83	[0,52;1,13]	0,102	+/- 0,011	0,945	c
	Rural	-S9	0,96	[0,62;1,29]	0,339	+/- 0,012	0,994	c
		+S9	0,82	[0,26;1,38]	0,170	+/- 0,029	0,869	c

Tableau III.9 : Coefficients des modèles de régression linéaire obtenus sur la souche YG1041.
(Test F de Fisher ; c : p < 0,001)

Chacun des 12 modèles de régression (six échantillons +/- S9) est validé par l'existence d'une relation linéaire (p < 0,001) entre le facteur d'induction et les concentrations en PM_{2.5},

avec un coefficient de corrélation (R^2) compris entre 0,887 (1I) et 0,994 (2R) en l'absence de S9 et 0,723 (1I) et 0,945 (2U) en présence de S9. De plus, les intervalles de confiance associés à l'ordonnée à l'origine (β_0) dans chacune des régressions incluent la valeur 1. Ceci indique la cohérence entre la modélisation et les données biologiques. Les coefficients directeurs extraits (Figure III.6) permettent ainsi de classer les six échantillons de $PM_{2.5}$ selon leur pouvoir mutagène :

sans S9 : 1I (0,031) < 1U (0,049) < 2I (0,072) < 1R (0,149) < 2U (0,279) < 2R (0,339)
 avec S9 : 1I (0,012) < 1U (0,019) \approx 2I (0,022) < 1R (0,032) < 2U (0,102) < 2R (0,170).

3.5. Corrélation avec la composition des $PM_{2.5}$

Nous avons enfin évalué les corrélations entre la composition chimique des échantillons de $PM_{2.5}$ et les réponses des différentes souches de *Salmonella typhimurium*. La réponse de la souche TA102 semble être non-spécifique, avec des coefficients de corrélation significatifs pour la quasi-totalité des composés chimiques testés. A l'inverse, les souches TA98 et YG1041 réagissent fortement aux HAP, et en particulier aux B[a]P-CEC (Tableau III.10).

	Métaux Transition	Autres Métaux	HAP	B[a]P-CEC
TA102 -S9	0,740	0,703	0,548	0,228
TA102 +S9	0,781	0,829	0,595	0,263
TA102 -DMSO	0,406	0,624	0,633	0,453
TA98 -S9	0,172	0,051	0,688	0,901
TA98 +S9	0,307	0,117	0,759	0,930
YG1041 -S9	0,311	0,290	0,810	0,903
YG1041 +S9	0,437	0,401	0,882	0,866


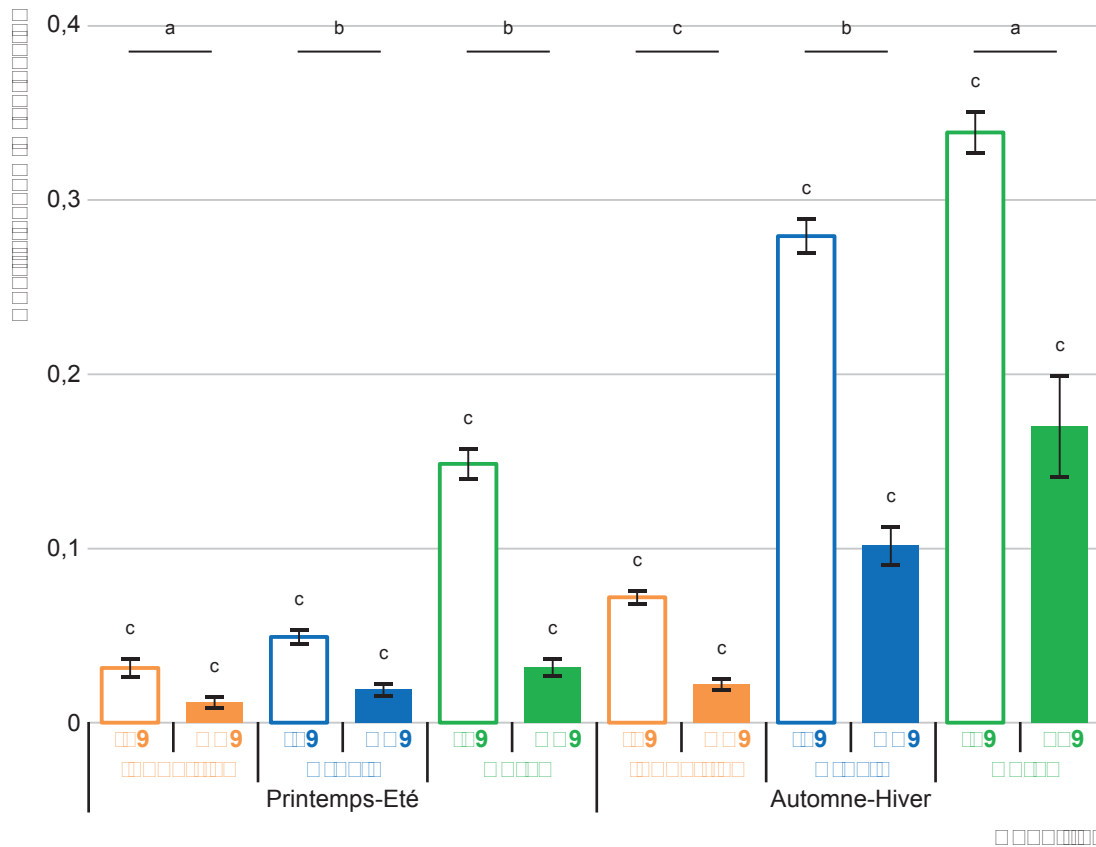


Tableau III.10 : Corrélations entre la composition des $PM_{2.5}$ et les facteurs d'induction.
 les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives (ρ de Spearman, $p < 0,05$)

3.6. Discussion

Les tests d'Ames avaient pour objectif d'évaluer le potentiel mutagène intrinsèque des particules prélevées. Nous avons utilisé trois souches de *Salmonella typhimurium* de sensibilité différente, avec ou sans activation métabolique. La mutagénicité de nombreux échantillons de $PM_{2.5}$ a déjà été évaluée dans la littérature, mais la quasi-totalité des études publiées jusqu'alors ont été réalisées sur la fraction organique extractible (Extractable Organic Matter, EOM). Ceci soulève plusieurs problèmes liés (i) à la concentration très importante en composés organiques dans cette EOM, (ii) à la représentativité de l'extrait par



□□□□□□ □□6 □ Coefficients directs (β_1) extraits, par la méthode des surfaces de réponse, de la régression linéaire réalisée sur les facteurs d'induction obtenus pour la souche YG1041, en absence ou en présence de fraction S9.

Moyenne \pm ET, $n = 2 \times 3$; Régression : test F de Fisher ; Comparaison +/- S9 : ANOVA

a : $P < 0,05$; b : $P < 0,01$; c : $P < 0,001$

rapport à l'échantillon initial, (iii) à l'absence de considération quand à la biodisponibilité réelle des constituants et (iv) à l'impossibilité de prendre en compte la nature particulière des PM_{2.5} (Claxton *et al.*, 2004; deKok *et al.*, 2006). Afin de contourner ces écueils, nous avons pris le parti, dans le cadre de cette étude, d'étudier les particules dans leur intégralité.

La souche TA102 a ainsi été utilisée pour étudier l'implication du stress oxydant généré par les PM_{2.5}, possiblement lié à la production de ROS en surface des particules ou à la présence au sein des PM_{2.5} de métaux de transition, pouvant catalyser dans la réaction de Fenton, tels que le fer, le cuivre, le manganèse, l'aluminium ou le chrome, et de HAP dont la métabolisation peut générer des ROS (Risom *et al.*, 2005). Malgré les coefficients de corrélation significatifs avec les métaux, l'effet observé est de très faible amplitude et semble indépendant de la présence de S9 et constant entre les différents sites, suggérant que, dans le modèle bactérien utilisé, les mutations induites seraient majoritairement dues à la particule elle-même. Vu le faible niveau de réponse, nous nous sommes interrogés sur une éventuelle atténuation du facteur d'induction due au rôle de piègeur de radicaux du DMSO (Grey and Adlercreutz, 2003). De manière surprenante, la réponse aux particules resuspendues dans du tampon phosphate a été encore plus faible que précédemment. Il semble donc que la souche TA102 ne soit pas un modèle adapté à la mise en évidence d'une mutagénicité induite par un éventuel stress oxydant généré par les PM_{2.5} natives.

Nous avons poursuivi notre étude sur la souche TA98, sensible aux mutagènes *frameshift* ne nécessitant pas d'activation métabolique, ainsi qu'aux HAP après activation métabolique par la fraction S9. Bien qu'une réponse significative ait été observée pour la plupart des échantillons de particules, aucune augmentation n'a été détectée après activation métabolique. Ce résultat pourrait sembler assez surprenant au vu des quantités relativement importantes de HAP détectées au sein des aérosols collectés (Tableau II.1), des coefficients de corrélation observés et du fait que la concentration en HAP ait été associée à la mutagénicité des PM_{2.5} dans plusieurs études (Elassouli *et al.*, 2007; Gilli *et al.*, 2007; Pastorková *et al.*, 2004). Néanmoins, cette différence pourrait s'expliquer par une biodisponibilité moindre des HAP dans les particules totales, en comparaison avec les EOM, et par le fait que les HAP ne représentent pas les composés les plus mutagènes au sein des particules atmosphériques (Claxton *et al.*, 2004).

La troisième souche que nous avons utilisée est la souche YG1041, caractérisée par une activité nitro-réductase accrue. Les tests réalisés ont mis en évidence un potentiel mutagène très important des PM_{2.5}. Cette réponse amplifiée de la souche YG1041 par rapport à la souche TA98 a déjà été décrite (Pastorková *et al.*, 2004). Associée à une nette diminution de l'effet en présence de fraction S9, cette observation suggère un rôle prépondérant des

composés aromatiques nitrés dans la mutagénicité des particules collectées, tel qu'évoqué par des études antérieures (Traversi *et al.*, 2009, 2011). En outre, les composés nitro-aromatiques sont connus pour être de puissants mutagènes chez les bactéries et auraient une plus grande biodisponibilité que les HAP de par leur caractère plus polaire, deux facteurs qui concourraient à l'induction d'une réponse significative à des doses relativement faibles (Maeda *et al.*, 2007). La très forte corrélation entre les concentrations en HAP (ou leurs équivalents toxiques) et la réponse de la souche YG1041 ne contredit pas cette hypothèse, car les composés nitroaromatiques sont formés dans l'atmosphère en présence de HAP et de NO₂ (Finlayson-Pitts and Pitts, 1997). Cependant, ce type de composé n'a pas pu être mis en évidence dans les PM_{2.5} par le protocole utilisé en GC/MS, et ces hypothèses ne pourront donc être confirmées ou infirmées qu'après dosage par une méthode adaptée à haute résolution (HR/GC-HR/MS).

Les résultats obtenus par test d'Ames sur des particules natives nous permettent de tirer trois conclusions majeurs à savoir : (i) que la souche YG1041 est vraisemblablement la plus à même de révéler un potentiel mutagène des PM_{2.5}, (ii) que les HAP ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans la mutagénicité globale des particules et (iii) que les composés nitroaromatiques seraient les composés majoritairement impliqués dans le mutagénicité des PM_{2.5} (Claxton *et al.*, 2004; Pastorková *et al.*, 2004; Traversi *et al.*, 2009, 2011).

4. TESTS DE CYTOTOXICITE

Ayant mis en évidence le potentiel mutagène des $PM_{2.5}$, nous avons souhaité poursuivre notre étude par l'évaluation de différents paramètres génotoxiques et épigénétiques sur la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B. Une telle étude nécessite cependant de réaliser une évaluation préalable de la cytotoxicité des $PM_{2.5}$ sur les cellules utilisées, afin de déterminer des concentrations de travail pertinentes.

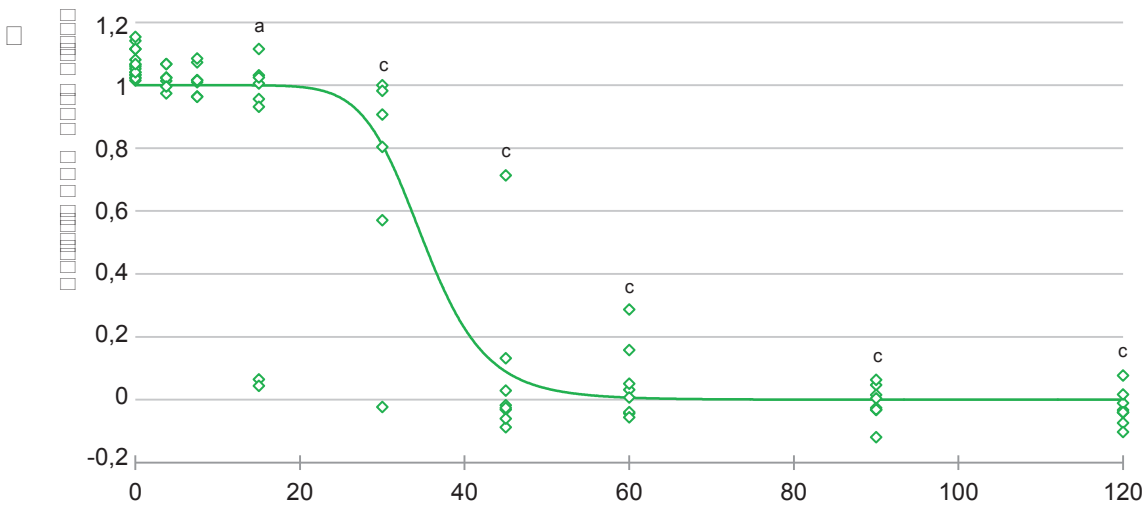
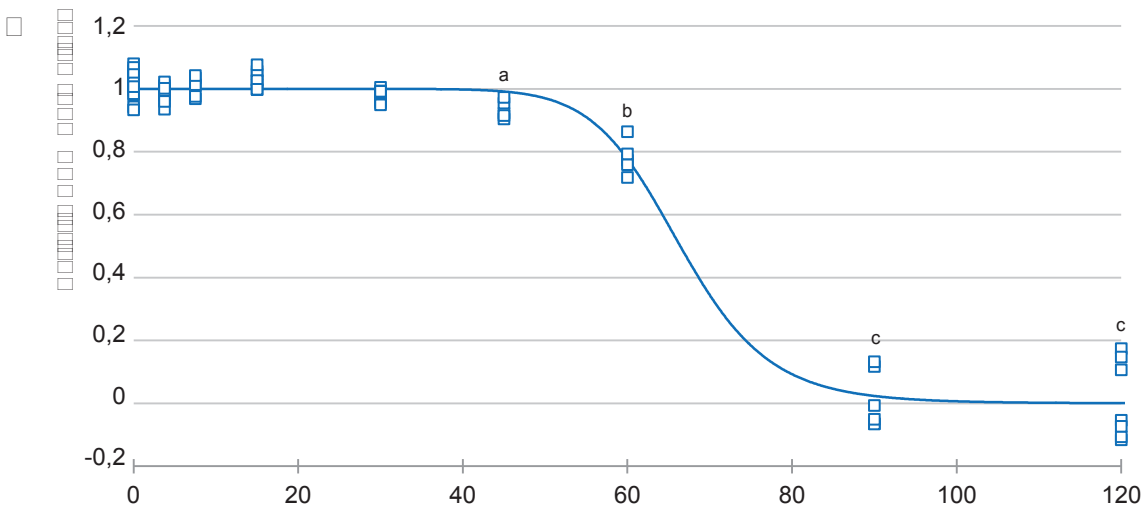
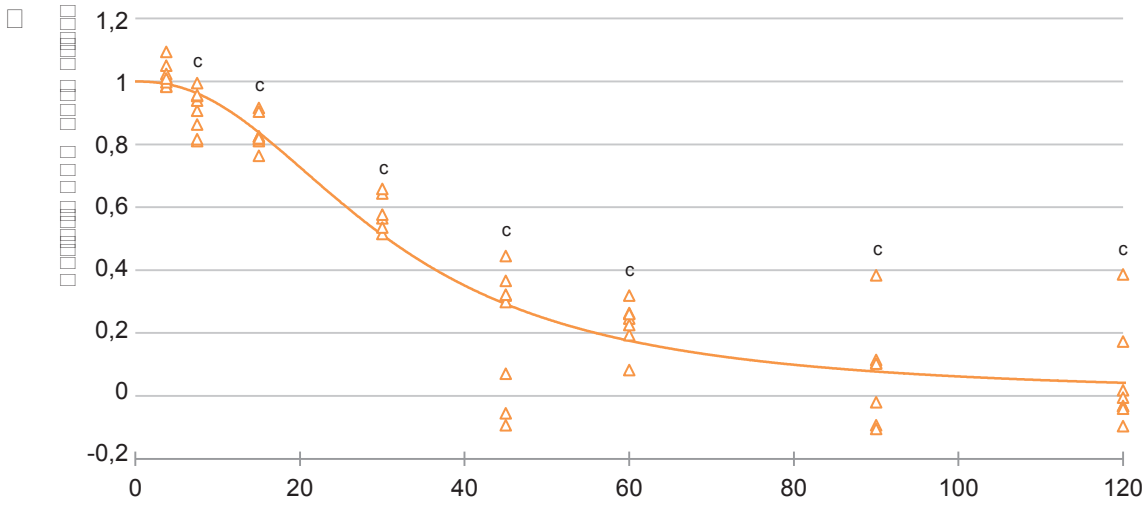
La cytotoxicité des six échantillons de $PM_{2.5}$ a donc été évaluée après 24, 48 et 72 h d'exposition à des concentrations comprises entre 3,75 et 120 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, grâce à trois méthodes complémentaires : le dosage de l'activité déshydrogénase mitochondriale (DHm), le dosage de l'activité extracellulaire de la lactate déshydrogénase et la mesure de l'incorporation de BrdU à l'ADN. Seuls les résultats obtenus par le dosage de l'activité DHm après 72 h d'exposition seront présentés à titre d'exemple.

4.1. Résultats expérimentaux

Les mesures des activités DHm dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ pendant 72 h montrent une diminution dose-dépendante de l'activité mitochondriale (valeurs expérimentales normalisées symbolisées par les marqueurs sur les Figures III.7 et III.8). Ainsi, les cellules exposées aux particules 1I pendant 72 h voient leur activité DHm se réduire significativement pour une concentration en $PM_{2.5}$ supérieure ou égale à 7,5 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, contre 45 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les particules 1U et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour l'échantillon 1R ($p < 0,05$) (Figure III.7). Concernant les $PM_{2.5}$ prélevées en automne et en hiver, l'activité DHm des cellules exposées semble augmenter pour les concentrations les plus faibles (7,5 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$) pour les trois échantillons. Cette augmentation est suivie d'une brusque chute dose-dépendante de l'activité, au-delà de 30 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les échantillons 2I et 2U, et de 60 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les $PM_{2.5}$ 2R ($p < 0,001$) (Figure III.8).

4.2. Modélisation

Les résultats expérimentaux ont ensuite été modélisés par une régression logistique à 4 paramètres, classiquement utilisée pour évaluer des relations dose-réponse. L'ensemble des points expérimentaux a été utilisé, hormis pour l'échantillon 1I pour lequel les valeurs obtenues à 3,75 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ont été utilisées comme référence afin de permettre la modélisation. Une normalisation par rapport aux témoins négatif (cellules non-exposées ou

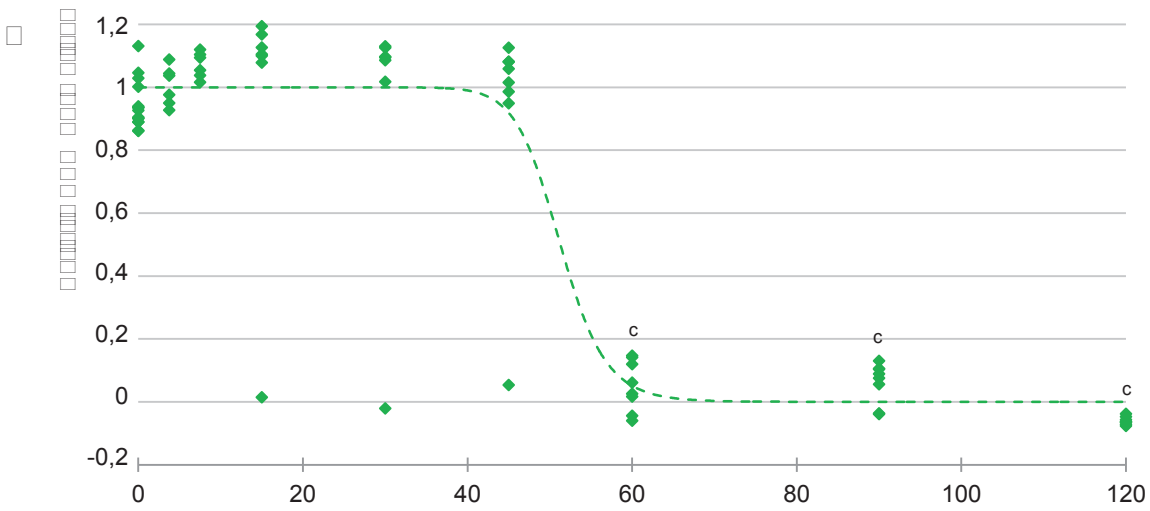
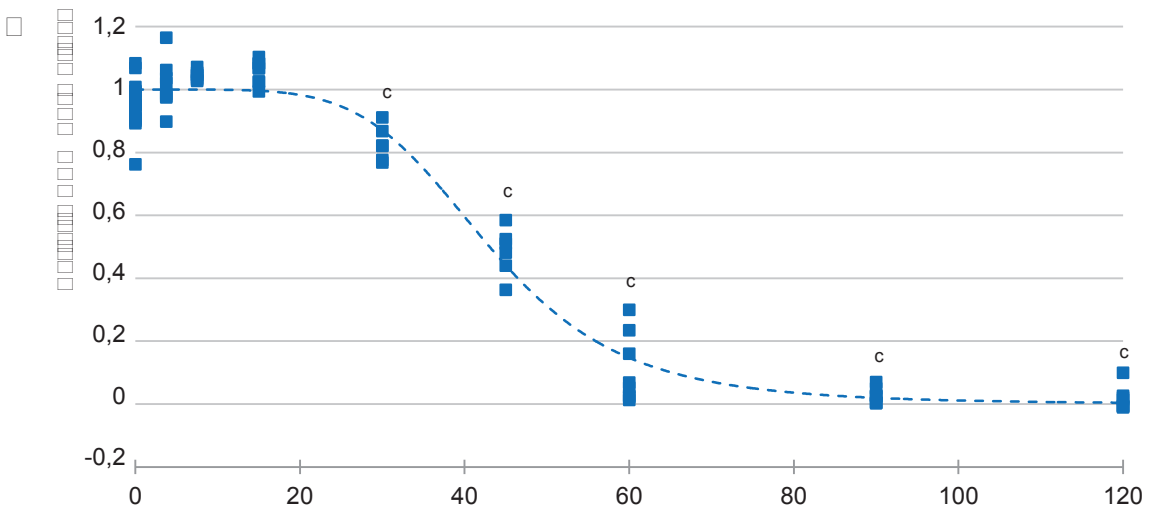
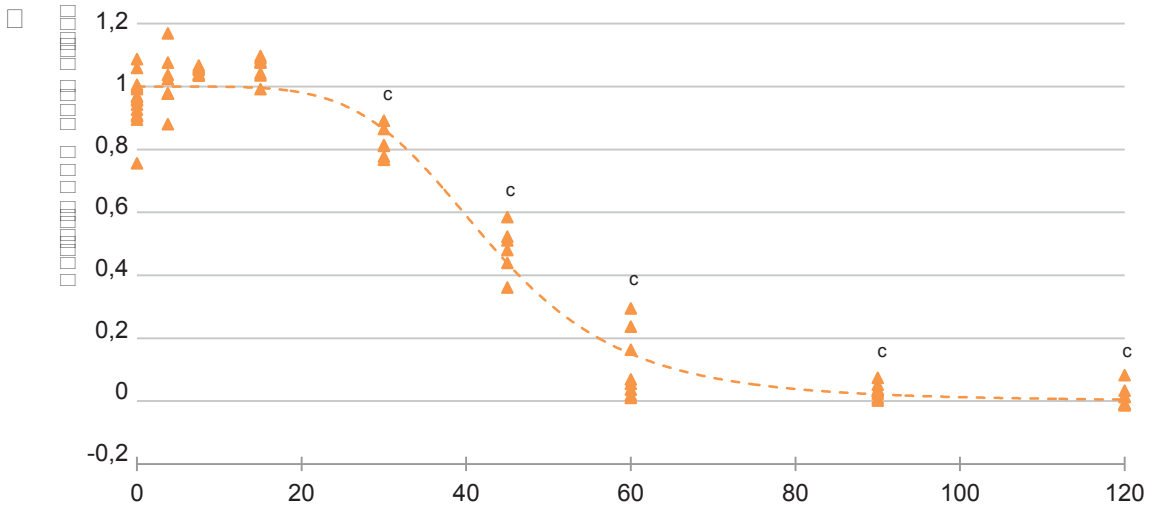


□□□□ 2.5 □□□□ □□□□ 2

□□□□□ □□□□ 7 □ Activité DésHydrogénase mitochondriale (DHm) mesurée dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} d'origine industrielle (A), urbaine (B) ou rurale (C) collectés au cours de la campagne printemps-été. Le trait représente le modèle de régression logistique à 4 paramètres calculé à partir des données expérimentales.

n = 8 ; Comparaison aux cellules non-exposées (= 1) : test U de Mann-Whitney

a : *P* < 0,05 ; b : *P* < 0,01 ; c : *P* < 0,001



PM_{2.5}

Activité DésHydrogénase mitochondriale (DHm) mesurée dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} d'origine industrielle (A), urbaine (B) ou rurale (C) collectés au cours de la campagne automne-hiver. Le trait représente le modèle de régression logistique à 4 paramètres calculé à partir des données expérimentales.

$n = 8$; Comparaison aux cellules non-exposées (= 1) : test U de Mann-Whitney

c : $P < 0,001$

3,75 µg / cm² pour l'échantillon 1I, témoin 100 % d'activité) et positifs (Triton X-100 1 %, témoin activité nulle) a permis de s'affranchir de deux paramètres (maximum = 1 et minimum = 0), afin d'obtenir la relation suivante :

$$\text{activité DHm} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[\text{PM}_{2.5}]}{\beta_1}\right)^{\beta_2}}$$

où β_1 représente le point d'inflexion de la courbe, soit la concentration inhibant à 50 % (CI₅₀) l'activité DHm, et β_2 l'asymétrie de la courbe, proportionnelle à la vitesse de réduction de l'activité DHm en fonction de la concentration en PM_{2.5}.

Les données modélisées sont matérialisées par les courbes sur les Figures III.7 et III.8. Les modèles permettent une très bonne qualité de représentation, avec des coefficients de corrélation compris entre 0,808 pour l'échantillon 2R et 0,977 pour l'échantillon 1U. En plus des CI₅₀ obtenues directement à partir du modèle (β_1), les concentrations en PM_{2.5} inhibant à 10 % (CI₁₀) l'activité DHm ont été calculées pour chacun des six échantillons. Les valeurs de CI₁₀ et CI₅₀, leurs écart-types, ainsi que les coefficients associés aux modèles sont repris dans le Tableau III.11.







		CI ₁₀	écart-type CI ₁₀	CI ₅₀	écart-type CI ₅₀	β_2	écart-type β_2	R ²
Printemps-Eté		12	+/- 3	31	+/- 3	2,3	+/- 0,4	0,920
		55	+/- 5	66	+/- 2	12,3	+/- 3,6	0,977
Automne-Hiver		28	+/- 5	35	+/- 2	9,3	+/- 3,2	0,810
		28	+/- 2	43	+/- 1	5,2	+/- 0,6	0,972
		28	+/- 2	43	+/- 1	5,3	+/- 0,6	0,972
		46	+/- 7	51	+/- 3	18,6	+/- 7,8	0,808

Tableau III.11 : Coefficients des modèles de régression logistique.

4.3. Discussion

Nous avons cherché à évaluer la cytotoxicité des échantillons de particules sur les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B, afin de déterminer les concentrations à utiliser pour l'ensemble des autres tests. D'un point de vue global, les résultats obtenus après 72 h d'exposition mettent en évidence une cytotoxicité modérée à faible dose. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur deux autres modèles de cellules pulmonaires que sont les cellules A549 et les cellules L132, exposées à des particules de même type et pour lesquelles les concentrations létales à 10 % sont respectivement de 6,33 et 5,04 µg / cm² (Billet *et al.*, 2007; Garçon *et al.*, 2006). La mesure de l'activité DHm a permis de mettre en évidence une altération des fonctions mitochondriales aux

concentrations les plus fortes. Nous avons cependant observé une augmentation de l'activité DHm après exposition aux échantillons de la saison automne-hiver aux concentrations les plus faibles. Ce phénomène, retrouvé dans d'autres études, pourrait être lié à un accroissement de l'activité métabolique globale visant à métaboliser les composés organiques (Billet *et al.*, 2007; Garçon *et al.*, 2006). Au vu de ces résultats, les concentrations utilisées pour la suite de l'étude toxicologique (3,75 et 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$) n'auront pas d'effet majeur sur la viabilité des cellules BEAS-2B exposées.

5. METABOLISATION DES COMPOSES ORGANIQUES

Sachant que près de 75 % des molécules cancérigènes seraient en réalité des pro-cancérigènes transformés par l'organisme en agents génotoxiques, il apparaît primordial d'évaluer le potentiel de métabolisation des cellules, et sa modulation par l'exposition aux échantillons de PM_{2.5}.

5.1. Expression génique des EMX

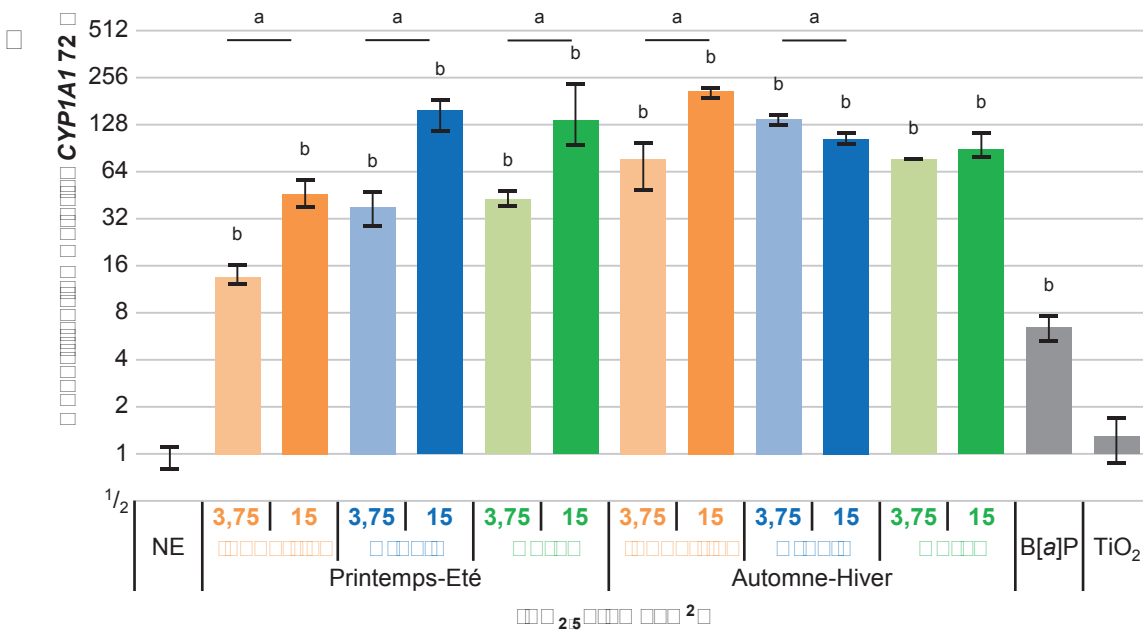
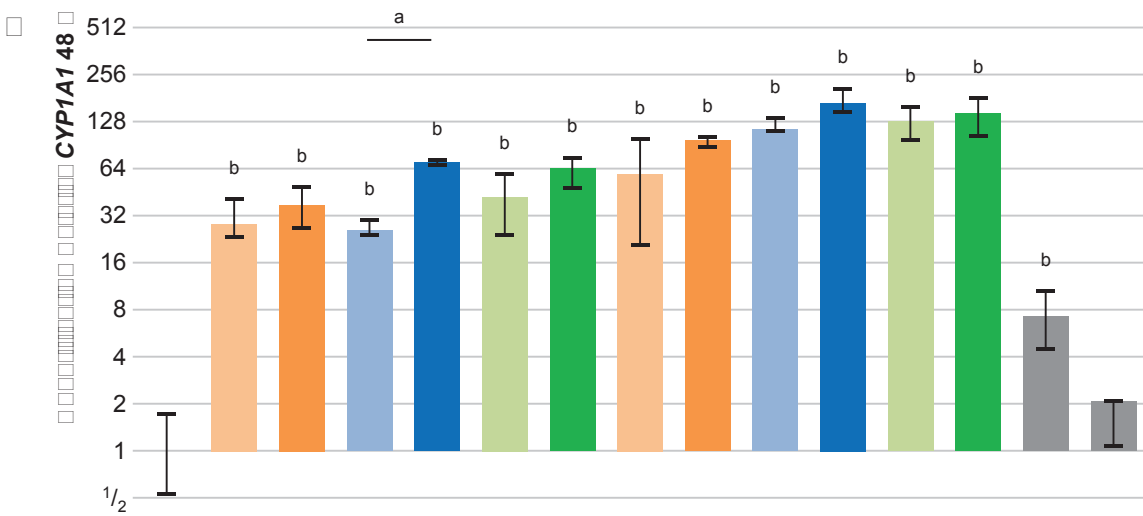
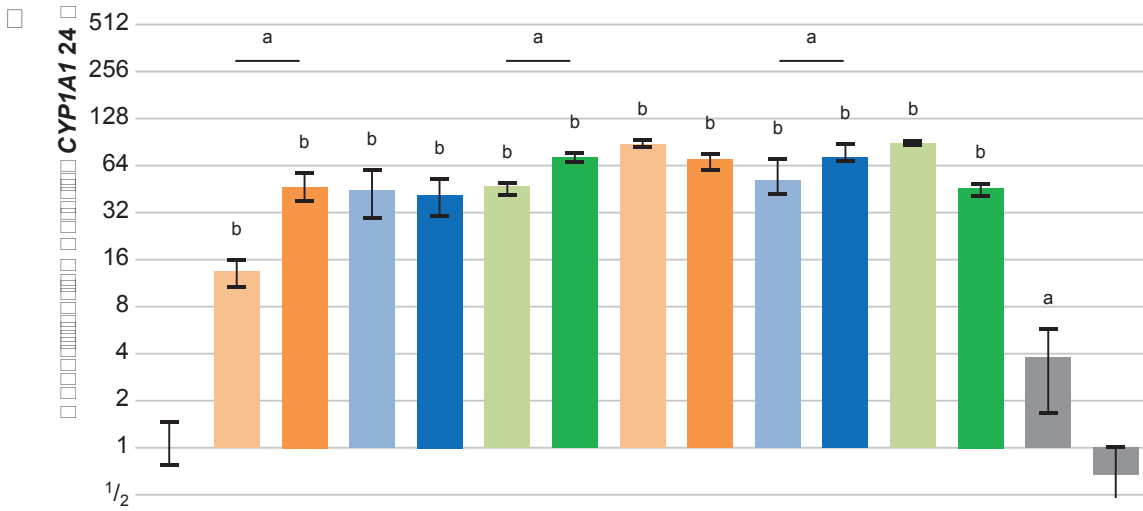
Nous avons ainsi mesuré le niveau d'expression de gènes codant pour quatre enzymes de métabolisation des xénobiotiques (Cytochromes P450 - CYP - 1A1, 1B1 et 2S1, NADPH-Quinone Oxydoréductase 1 - NQO1), dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 24, 48 ou 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

5.1.1. CYP1A1

La quantité d'ARNm codant pour le CYP1A1 est significativement augmentée après exposition aux PM_{2.5}, quels que soient le temps d'exposition, l'échantillon de PM_{2.5} et la concentration testés ($p < 0,01$) (Figure III.9). Les quantités d'ARNm mesurées dans les cellules exposées aux PM_{2.5} sont 13,4 fois (1I1, 24 h) à 209 fois (2I2, 72 h) plus élevées que dans les cellules non-exposées. Le CYP1A1 est également induit dans les cellules exposées au B[a]P, mais à un niveau plus faible que dans les cellules exposées aux particules pour un même temps d'exposition. A l'inverse, l'exposition des cellules au TiO₂ ne modifie pas le niveau d'expression du CYP1A1.

Le niveau d'induction suit une relation dose-réponse significative ($p < 0,05$) pour les échantillons 1I, 1R et 2U après 24 h d'exposition (Figure III.9.A), pour les PM_{2.5} 1U à 48 h (Figure III.9.B) et pour les prélèvements 1I, 1U, 1R et 2I au temps d'exposition 72 h (Figure III.9.C).

Les niveaux de réponse sont globalement proches entre les échantillons de PM_{2.5} d'une même campagne au temps d'exposition 24 h. Cette uniformité s'accroît encore au temps 48 h, ou une seule différence peut être observée entre les échantillons 2I et 2U à la concentration 15 µg / cm². En revanche, de plus grandes variations sont mises en évidence après 72 h d'exposition, particulièrement entre les échantillons industriels et urbains (Tableau III.12).



Quantification de l'ARNm du Cytochrome P450 (CYP) 1A1 par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

CYP1A1 24 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	a		a	
	15		ns		ns
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				a

CYP1A1 48 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	ns		ns	
	15		ns		ns
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				ns

CYP1A1 72 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	a		a	
	15		a		ns
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				ns

CYP1A1 24 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	ns		ns	
	15		ns		ns
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				a

CYP1A1 48 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	ns		ns	
	15		a		ns
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				ns

CYP1A1 72 □		□ □ □ □ □		□ □ □ □ □	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	15	3,75	15	
□ □ □ □ □ □ □ □ □ □	3,75	a		ns	
	15		a		a
□ □ □ □ □	3,75			ns	
	15				ns

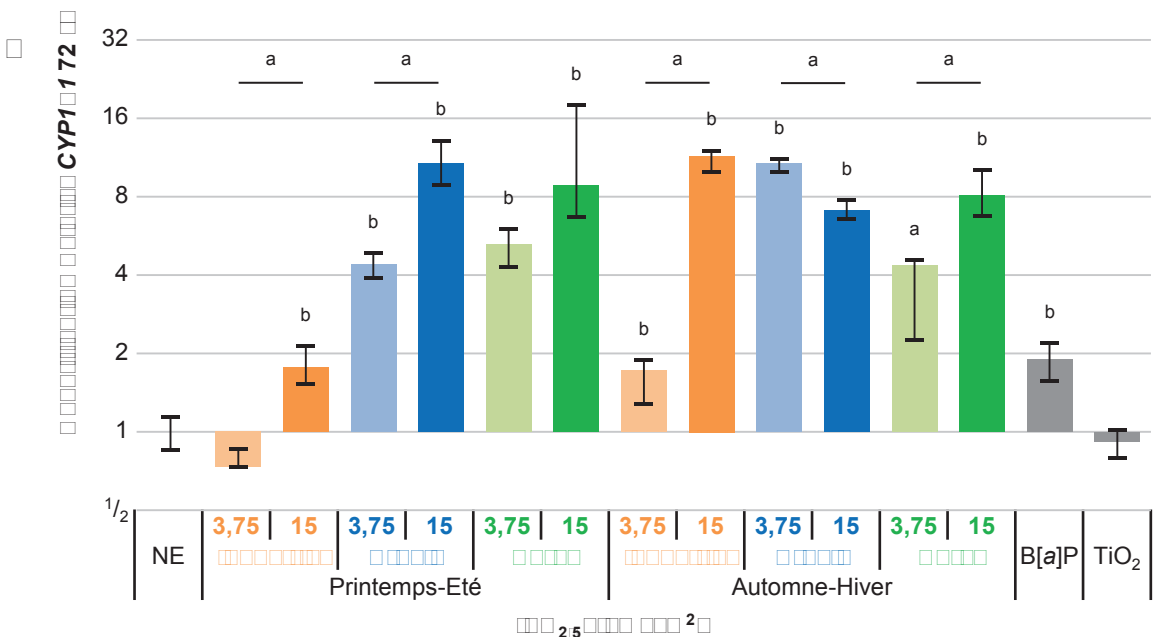
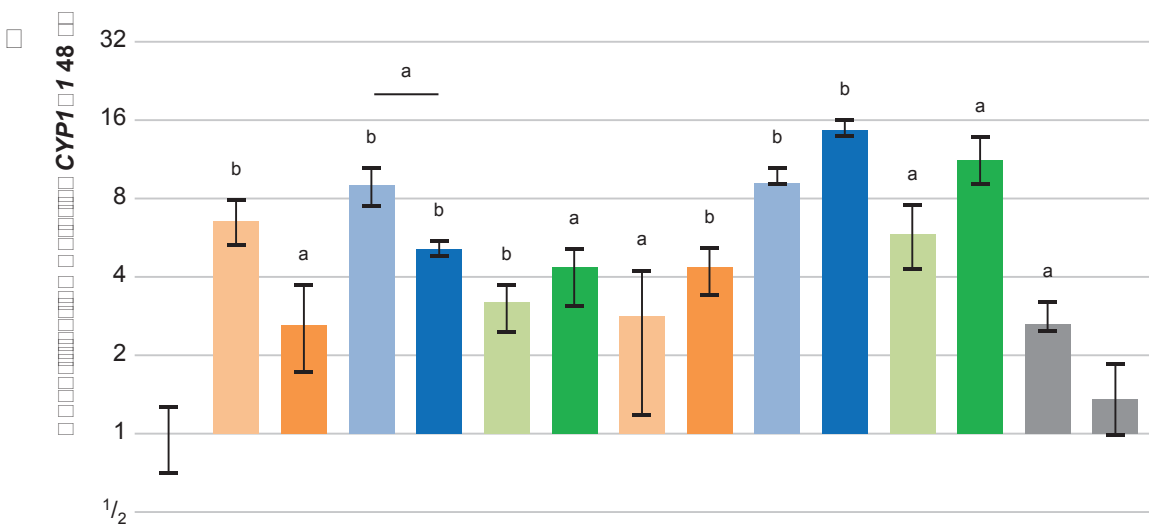
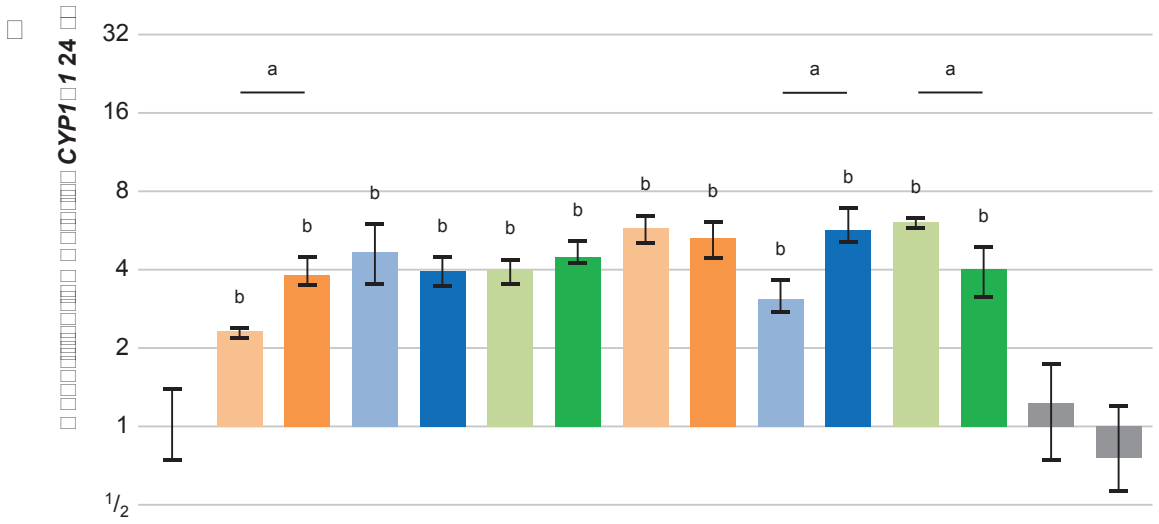
Tableau III.12 : Comparaisons intersites du niveau d'induction du *CYP1A1* en réponse aux $PM_{2.5}$.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$)

Des différences sont également observées entre les campagnes de prélèvement, avec, de manière générale, des quantités relatives d'ARNm supérieures après exposition aux particules collectées en saison automne-hiver. Ces différences sont significatives pour les conditions I1, U2, et R1 après 24h d'exposition, I2, U1 et U2 après 48 h, ainsi que I2 et U1 après 72 h ($p < 0,05$).

Nous avons enfin étudié les cinétiques de réponse aux échantillons de $PM_{2.5}$ pour le *CYP1A1*. Lorsque des différences significatives existent entre les RQ à 24 h et à 48 h, celles-ci vont toujours dans le sens d'une induction supérieure du gène à 48 h ($p < 0,05$). Ainsi, le niveau d'expression du *CYP1A1* est multiplié, entre les temps d'exposition 24 h et 48 h, respectivement par 2,1 ; 1,7 ; 1,4 ; 2,2 ; 2,4 et 3,1 dans les conditions 111, 1U2, 2I2, 2U1, 2U2 et 2R2. Les différences de RQ entre les temps d'exposition 48 et 72 h peuvent quant à elles aller dans le sens d'une induction (2I2, RQ multiplié par 2,2, $p < 0,05$) ou d'une inhibition (111 et 2U2, RQ divisé par 2,1 et 1,6, $p < 0,05$).

5.1.2. *CYP1B1*

Le niveau d'expression du *CYP1B1* est lui aussi augmenté de manière significative dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$, quels que soient le temps d'exposition, l'échantillon de



Quantification de l'ARNm du Cytochrome P450 (CYP) 1B1 par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm². Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

Les comparaisons réalisées pour le *CYP1B1* entre les deux campagnes de prélèvement donnent des résultats similaires à ceux obtenus pour le *CYP1A1*. Ainsi, les particules collectées au cours de la saison automne-hiver induisent plus fortement le *CYP1B1* que les $PM_{2.5}$ provenant du même site et de la saison estivale, pour les conditions I1, U2, R1 à 24 h, U2 et R2 à 48 h et I2 et U1 après 72 h d'exposition ($p < 0,05$).

Concernant la cinétique de réponse aux $PM_{2.5}$, les effets significatifs tendent vers une augmentation du niveau d'expression du *CYP1B1* entre 24 et 48 h d'exposition, avec des valeurs de RQ multipliées par 2,8 ; 1,9 ; 3,0 ; 2,6 et 2,8 respectivement pour les conditions 1I1, 1U1, 2U1, 2U2 et 2R2 ($p < 0,05$). Les variations observées entre les temps 48 et 72 h peuvent être des augmentations (RQ multiplié par 2,1 et 2,6, pour les conditions 1U2 et 2I2, $p < 0,05$) ou des diminutions (RQ divisé par 8,9 ; 2,0 ou 2,1 dans les conditions 1I1, 1U1 et 2U2, $p < 0,05$).

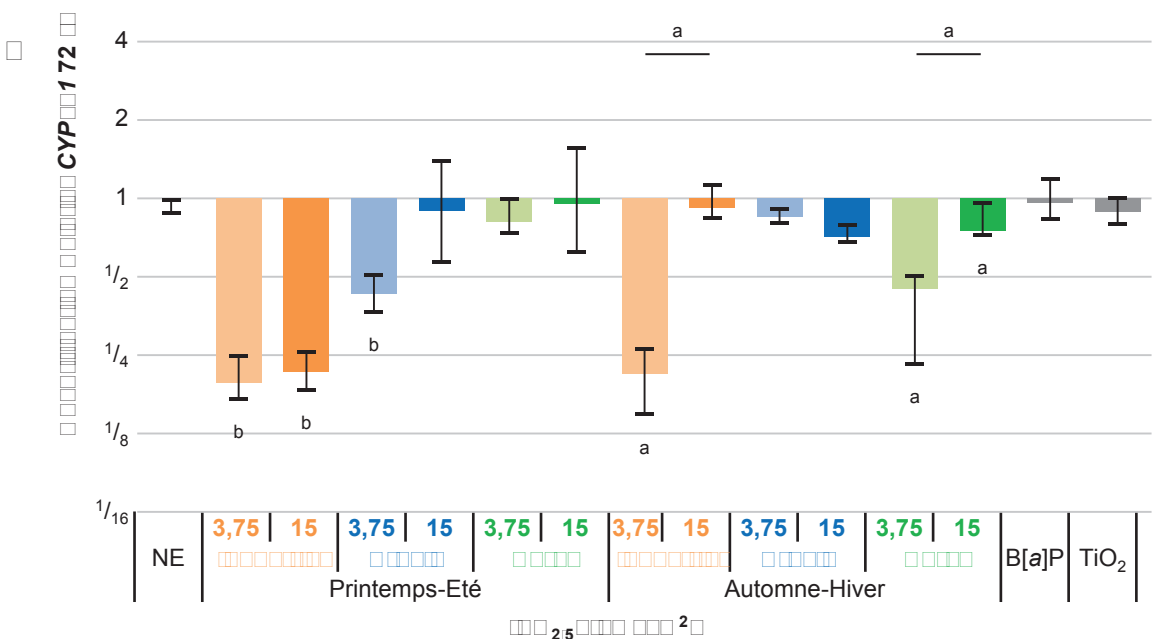
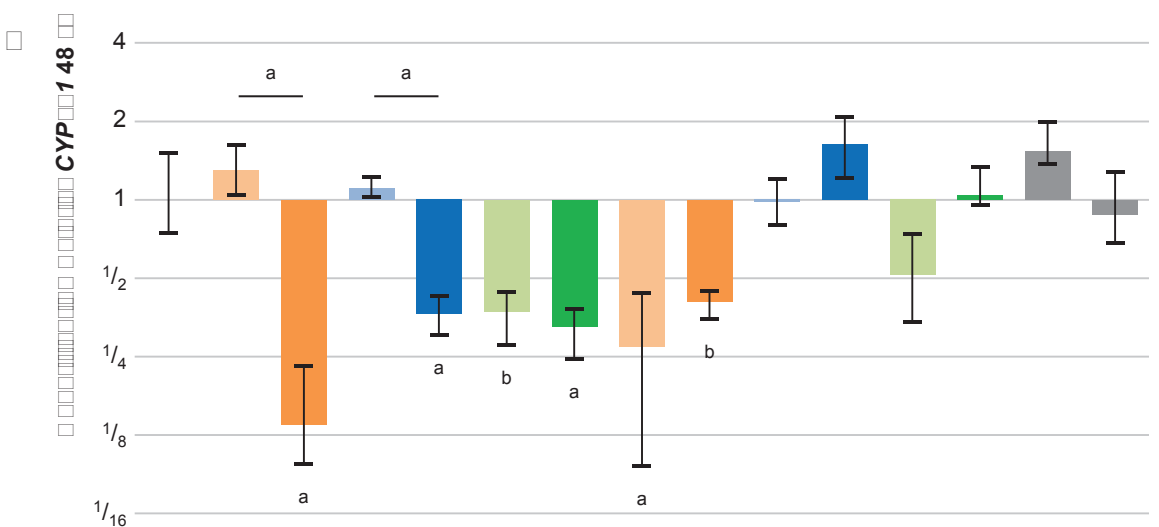
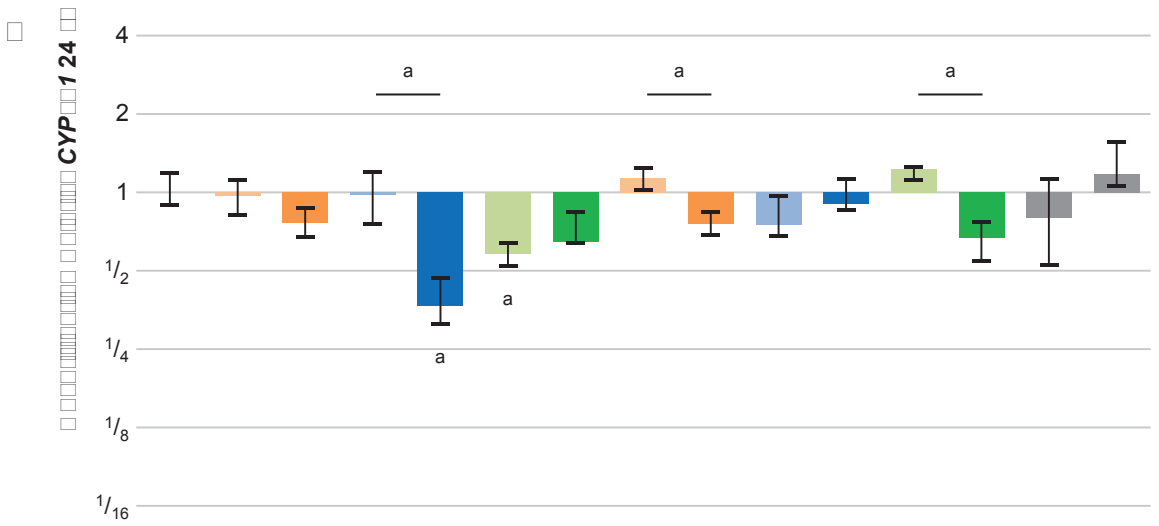
5.1.3. *CYP2S1*

Le niveau d'expression du *CYP2S1* est modifié dans certaines conditions d'exposition aux $PM_{2.5}$. En effet, une diminution significative ($p < 0,05$) de la quantité d'ARNm codant pour ce CYP est observée pour les conditions 1U2 et 1R1 à 24 h, 2I2, 2U2, 2R1/2 et 2I1/2 à 48 h et 1I1/2, 1U1, 2I1 et 2R1/2 à 72 h (Figure III.11). Les valeurs de RQ significativement inférieures au témoin s'échelonnent entre 0,75 (2R2, 72 h), soit une diminution de 25 % par rapport aux cellules non-exposées, et 0,14 (1I2, 48 h), correspondant à une quantité d'ARNm divisée par 7. A l'inverse, l'exposition des cellules au B[a]P ou au TiO_2 ne modifie pas le niveau d'expression du *CYP2S1*.

Les niveaux de réponse en fonction de la dose sont assez disparates. En effet, une relation dose-réponse significative est observée pour les échantillons 1U, 2I et 2R à 24 h (Figure III.11.A) et 1I et 1U à 48 h (Figure III.11.B), alors que la relation semble s'inverser après 72 h d'exposition (Figure III.11.C).

Les comparaisons intersites mettent en évidence des effets plus marqués pour les particules industrielles après 48 h ou 72 h d'exposition (Tableau III.14).

La comparaison des effets obtenus après exposition aux $PM_{2.5}$ provenant de campagnes de prélèvement différentes semble indiquer que les échantillons printemps-été inhibent de manière plus importante le *CYP2S1*. Ceci se traduit par des différences significatives entre les prélèvements urbains ($15 \mu g / cm^2$) et ruraux ($3,75 \mu g / cm^2$) à 24 h, urbains et ruraux



Quantification de l'ARNm du Cytochrome P450 (CYP) 2S1 par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm². Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

(15 µg / cm²) à 48 h, ainsi qu'entre les échantillons industriels (15 µg / cm²), urbains et ruraux (3,75 µg / cm²) après 72 h d'exposition ($p < 0,05$).

CYP1A2		3,75		15		3,75		15	
3,75	ns			a					
15			a				ns		
3,75					a				
15								a	

CYP1A8		3,75		15		3,75		15	
3,75	ns			a					
15			ns				ns		
3,75					a				
15								ns	

CYP1B1		3,75		15		3,75		15	
3,75	a			a					
15			a				a		
3,75						a			
15								ns	

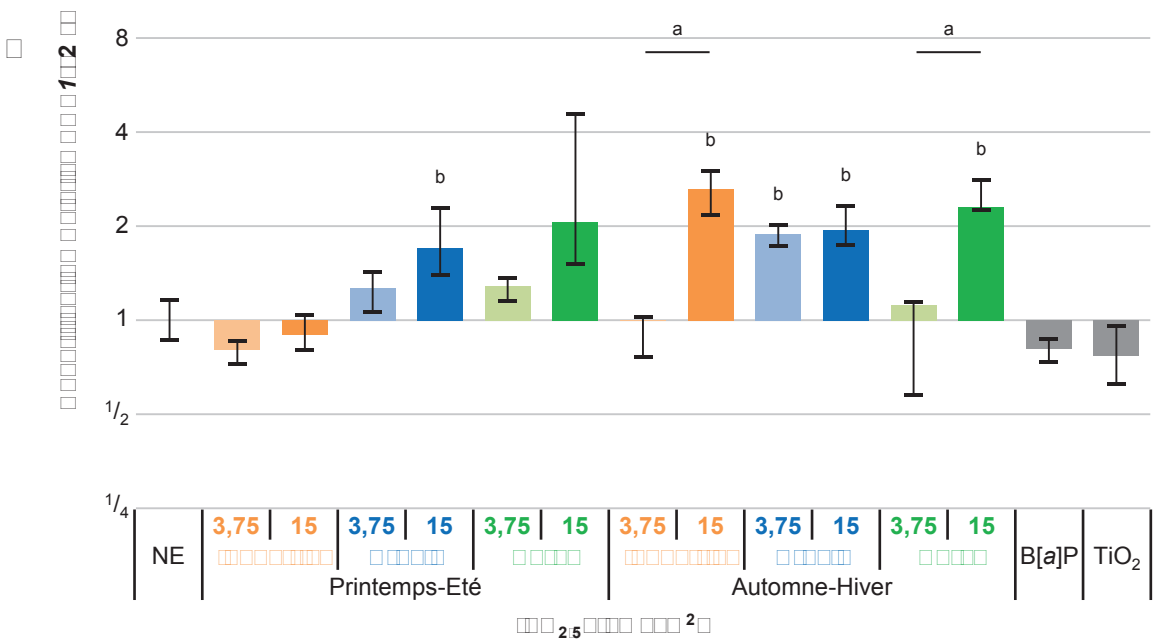
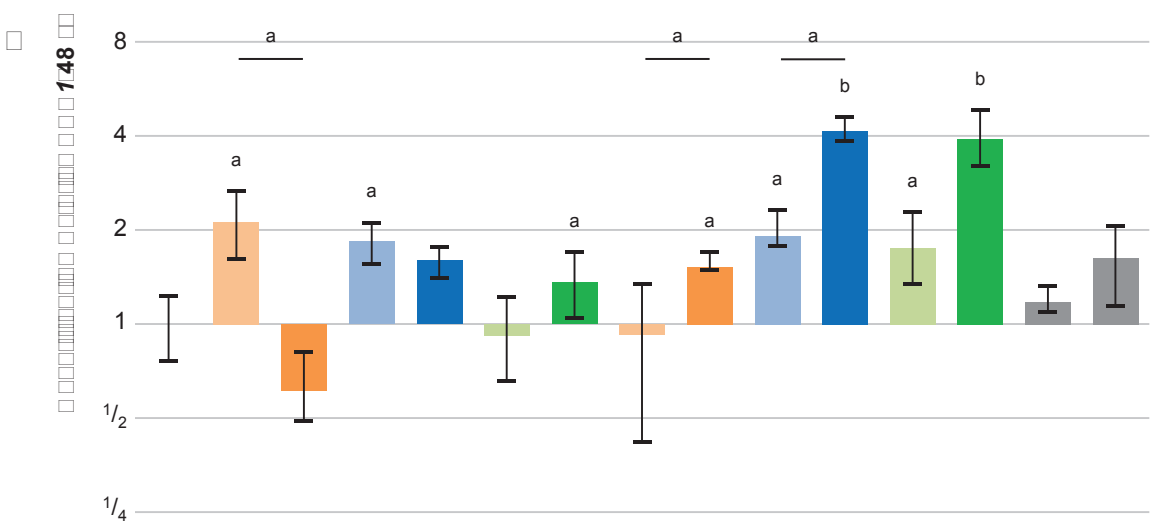
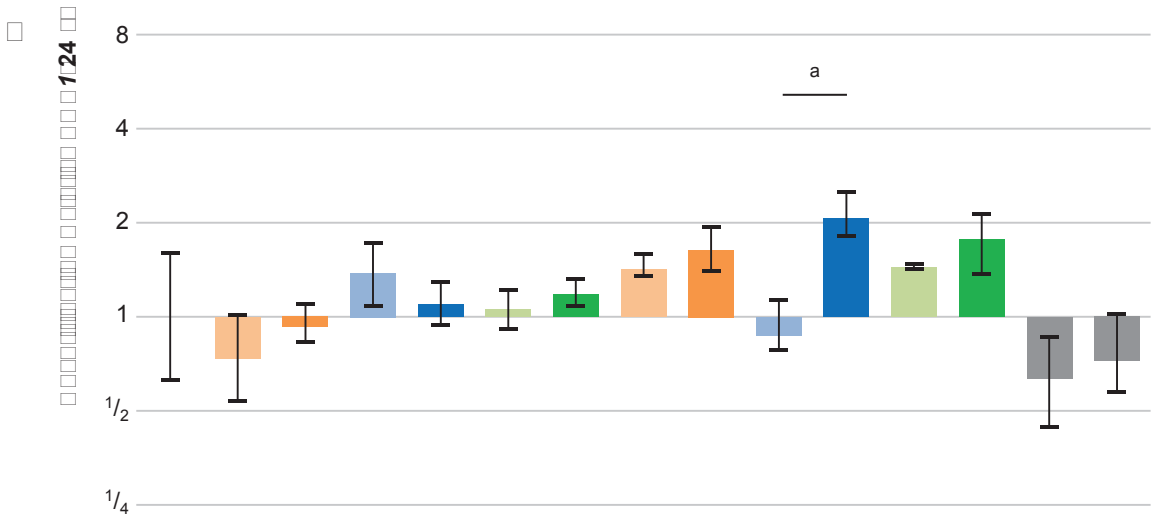
CYP1A2		3,75		15		3,75		15	
3,75	a					ns			
15				ns				ns	
3,75								a	
15									ns

Tableau III.14 : Comparaisons intersites du niveau d'induction du CYP2S1 en réponse aux PM_{2.5}.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$)

Enfin, l'étude de la cinétique de réponse met en évidence une inhibition du CYP2S1 après 48 h d'exposition par rapport au temps 24 h. La quantité d'ARNm est ainsi divisée par des facteurs compris entre 1,6 et 5,6 pour les conditions 1I2, 2R1/2, 2I1/2 et 2R1/2 ($p < 0,05$). En revanche, les RQ évoluent à la hausse (multiplié par 2,5, 2,2 et 2,3 pour les conditions 1U2, 1R1 et 2I2) ou à la baisse (divisé par 6,6 ou 2,6 pour les conditions 1I1 et 1U1) entre 48 et 72 h d'exposition.

5.1.4. NQO1

La dernière EMX étudiée est la NQO1. Son niveau d'expression n'est augmenté qu'après un minimum de 48 h d'exposition aux PM_{2.5} (Figure III.12). Les valeurs de RQ significatives à 48 h sont comprises entre 1,4 (1R2) et 4,1 (2U2), et entre 1,7 (1U2) et 2,6 (2I2) à 72 h ($p < 0,05$). Cependant, ni le B[a]P ni le TiO₂ ne modifient le niveau d'expression génique de la NQO1, aux temps et concentrations testés.



Quantification de l'ARNm de la NADPH-Quinone Oxydoréductase 1 (NQO1) par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

Lorsqu'il existe des différences significatives entre les deux concentrations pour un même échantillon, celles-ci vont dans le sens d'une relation dose-réponse ($p < 0,05$), hormis pour l'échantillon 1I à 48 h.

Il n'existe pas de différence entre les cellules exposées aux échantillons des différents sites après 24 h d'exposition, mais l'échantillon 2I semble avoir des effets inférieurs sur l'expression du *NQO1* après 48 h (Tableau III.15).

□□□ 1.48 □ □□□□□ □□□□□		□□□□□		□□□□□	
	3,75	15	3,75	15	
□□□□□□□□	3,75	ns		ns	
	15		a		ns
□□□□□	3,75			a	
	15				ns

□□□ 1.48 □ □□□□□ □□□□□		□□□□□		□□□□□	
	3,75	15	3,75	15	
□□□□□□□□	3,75	a		ns	
	15		a		a
□□□□□	3,75			ns	
	15				ns

□□□ 1.2 □ □□□□□ □□□□□		□□□□□		□□□□□	
	3,75	15	3,75	15	
□□□□□□□□	3,75	ns		ns	
	15		a		ns
□□□□□	3,75			ns	
	15				ns

□□□ 1.2 □ □□□□□ □□□□□		□□□□□		□□□□□	
	3,75	15	3,75	15	
□□□□□□□□	3,75	a		ns	
	15		ns		ns
□□□□□	3,75			a	
	15				ns

Tableau III.15 : Comparaisons intersites du niveau d'induction du *NQO1* en réponse aux $PM_{2,5}$.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$)

Les comparaisons intercampagnes, lorsqu'elles sont significatives, montrent des effets supérieurs des particules collectées lors de la saison automne-hiver, pour un site et une concentration donnés. Des différences significatives sont ainsi observées pour les conditions I1/2, U2 et R1 à 24 h d'exposition, I2, U2 et R2 à 48 h et I2 à 72 h.

Enfin, l'étude cinétique met en évidence une induction significative du *NQO1* entre 24 et 48 h d'exposition, avec des valeurs de RQ multipliées par 2 ou plus pour les conditions 1I1, 2U1/2 et 2R2 ($p < 0,05$). A l'inverse, la quantité d'ARNm codant pour la *NQO1* est réduite au minimum d'un facteur 1,4 entre les temps 48 et 72 h pour les conditions 1I1, 1U1 et 2U2 ($p < 0,05$). La seule augmentation mise en évidence entre 48 et 72 h concerne la condition 2I2 (RQ multiplié par 1,7).

5.2. Activité catalytique des CYP1A1 et 1B1

Au vu des niveaux d'induction extrêmement importants observés pour les CYP1A1 et 1B1, nous nous sommes intéressés à leur activité catalytique, mesurée grâce à la quantification de l'activité EthoxyRésorufine-O-Dééthylase (EROD) dans les cellules

BEAS-2B exposées pendant 24, 48 ou 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

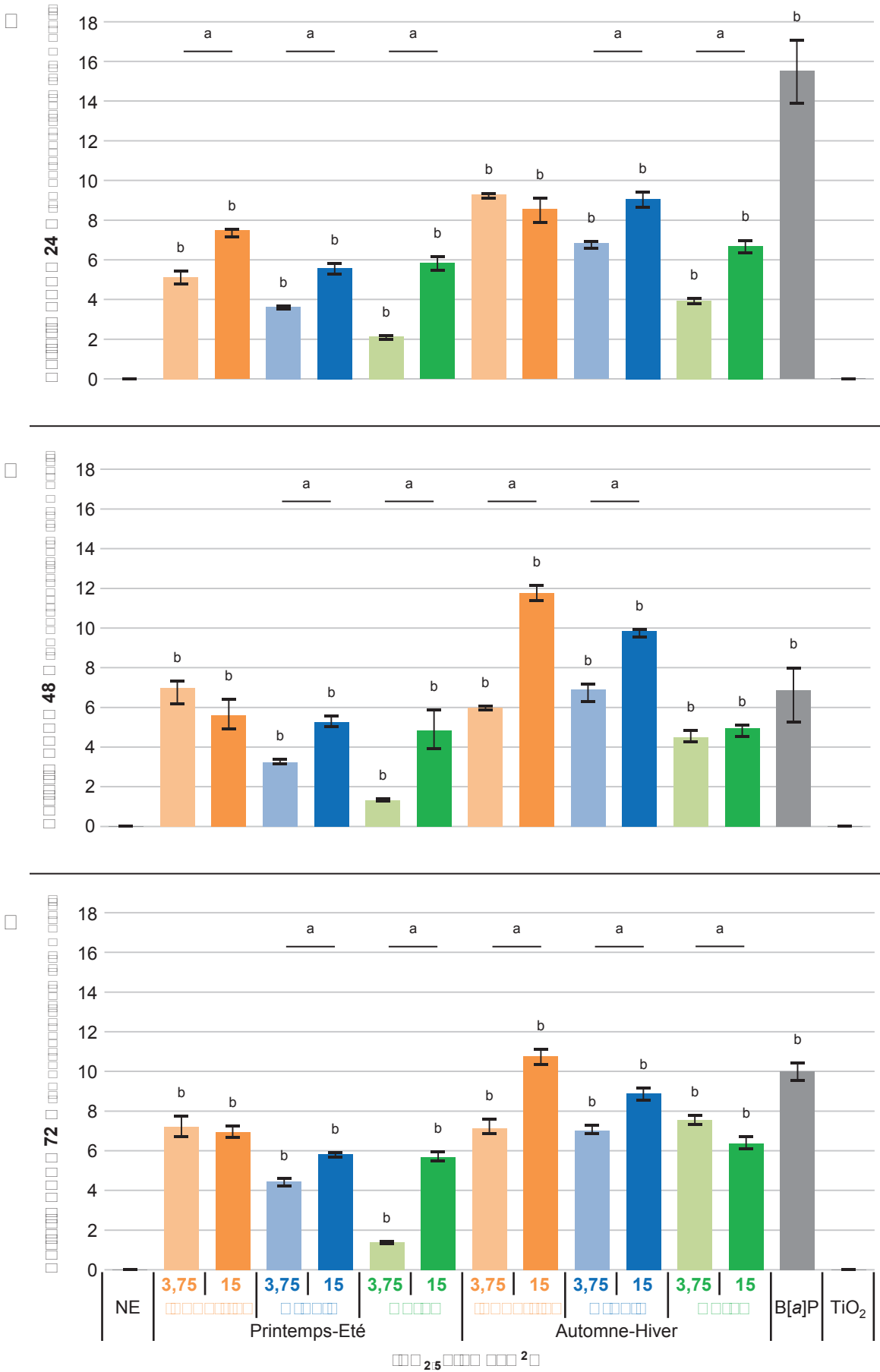
Alors que l'activité EROD mesurée dans les cellules non-exposées ou dans les cellules exposées au TiO₂ est quasi-nulle quel que soit le temps considéré, de la résorufine est formée en quantité significative dans les cellules exposées aux PM_{2.5} ou au B[a]P ($p < 0,01$), quels que soient le temps, l'échantillon et la concentration considérés (Figure III.13). Après 24 h d'exposition aux PM_{2.5}, les quantités de résorufine formées par minute et par mg de protéines sont comprises entre 2,1 nmol (1R1) et 9,3 nmol (2I1). Elles s'échelonnent entre 1,3 nmol (1R1) et 11,8 nmol (2I2) à 48 h, et entre 1,4 nmol et 10,8 nmol pour les mêmes échantillons à 72 h.

Les niveaux d'activité EROD suivent une relation dose-réponse ($p < 0,05$) quelle que soit la durée de l'exposition aux PM_{2.5}, avec pour seules exception les conditions 2I à 24 h, et 1I et 2R à 48 et 72 h.

Les comparaisons intersites mettent en évidence de nombreuses différences entre les échantillons collectés au cours d'une même campagne (Tableau III.16). Ainsi, les cellules exposées aux particules collectées sur le site industriel présentent une activité EROD plus importante que celles exposées aux particules urbaines ou rurales, et ce pour au moins l'une des deux concentrations quels que soient la saison de prélèvement et le temps d'exposition.

24 h		3,75		15		3,75		15	
1R1	3,75	a		a					
1R2	15		a			ns			
1R3	3,75			a					
1R4	15					a			
2R1	3,75								
2R2	15								a
2R3	3,75								
2R4	15								a
2I1	3,75								
2I2	15								a
2I3	3,75								
2I4	15								a
3R1	3,75								
3R2	15								
3R3	3,75								
3R4	15								
3I1	3,75								
3I2	15								
3I3	3,75								
3I4	15								

Tableau III.16 : Comparaisons intersites de l'activité EROD en réponse aux PM_{2.5}.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$)



13 Mesure de l'activité EthoxyRésorufine-O-Dééthylase (EROD) dans les cellules BEAS-2B exposées ou non (NE) pendant 24 h (A), 48 h (B) ou 72 h (C) aux échantillons de PM_{2,5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm². Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE et effet dose : tests U de Mann-Whitney a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

De plus, les particules collectées au cours de la saison automne-hiver ont généralement un effet plus marqué que les particules correspondantes de la saison printemps-été. Ainsi, l'activité EROD peut être multipliée par 5,51 entre les conditions 1R1 et 2R1 après 72 h d'exposition (Tableau III.17).

□□□□		3,75 µg / cm ²		15 µg / cm ²	
		AH/PE	p	AH/PE	p
□□□□□□□□	24 h	1,81	a	1,14	a
	48 h	0,86	ns	2,10	a
	72 h	0,99	ns	1,55	a
□□□□□	24 h	1,88	a	1,62	a
	48 h	2,15	a	1,87	a
	72 h	1,58	a	1,53	a
□□□□□	24 h	1,83	a	1,15	a
	48 h	3,46	a	1,02	ns
	72 h	5,51	a	1,12	a

Tableau III.17 : Comparaisons intercampagnes de l'activité EROD en réponse aux PM_{2.5}.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : p < 0,05)

L'analyse de l'activité EROD en fonction des durées d'exposition montre que celle-ci est relativement constante au cours du temps. Quelques différences sont cependant observées pour les échantillons 2I et 2R, allant dans le sens d'une augmentation de l'activité EROD entre les temps d'exposition 48 et 72 h (p < 0,05).

5.3. Corrélation avec la composition des PM_{2.5}

Nous avons enfin évalué les corrélations entre la composition chimique des échantillons de PM_{2.5} et l'induction des EMX. L'induction génique du CYP1A1 est très majoritairement liée à la quantité de HAP, surtout si l'on considère les B[a]P-CEC. Cette corrélation est légèrement moins marquée pour le CYP1B1, bien que toujours présente. A l'inverse l'expression du gène codant pour la NQO1 ne semble pas être reliée à un élément chimique particulier. Enfin, l'activité EROD est à la fois corrélée aux HAP et aux métaux de transition. (Tableau III.18).

		Métaux Transition	Autres Métaux	HAP	B[a]P-CEC
RQ CYP1A1	24h	-0,047	0,373	0,230	0,464
	48h	0,043	-0,280	0,595	0,734
	72h	0,222	-0,098	0,537	0,673
RQ CYP1B1	24h	0,056	-0,182	0,248	0,351
	48h	-0,111	-0,115	0,299	0,329
	72h	0,055	-0,042	0,426	0,583
RQ CYP2S1	24h	0,084	-0,157	0,426	0,520
	48h	-0,001	-0,082	0,420	0,426
	72h	0,130	-0,008	0,556	0,665
RQ NQO1	24h	-0,113	0,347	-0,075	-0,003
	48h	-0,220	-0,189	0,080	0,120
	72h	-0,110	-0,167	0,279	0,499
Activité EROD	24h	0,470	-0,146	0,623	0,616
	48h	0,530	-0,129	0,470	0,414
	72h	0,472	-0,201	0,553	0,478

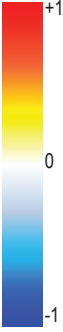


Tableau III.18 : Corrélations entre la composition des PM_{2.5} et l'induction des EMX.
 les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives (ρ de Spearman, $p < 0,05$)

5.4. Discussion

Nous avons en premier lieu cherché à évaluer le niveau d'expression de gènes codants pour quatre EMX : les CYP1A1, 1B1 et 2S1, ainsi que la NQO1. Le choix de ces cibles est justifié par l'implication de ces enzymes dans la métabolisation des HAP, retrouvés en quantités importantes dans nos différents échantillons de PM_{2.5}.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une induction forte du CYP1A1, associée à une induction plus faible du CYP1B1. Ces résultats sont en adéquation avec de précédentes études ayant mis en évidence l'induction de ces deux gènes après exposition de cellules pulmonaires à des PM_{2.5} ou à leurs extraits organiques (Andryśík *et al.*, 2011; Billet *et al.*, 2007, 2008; Val *et al.*, 2013). Cette induction implique vraisemblablement l'activation de l'Ahr (Andryśík *et al.*, 2011). En effet, il a été démontré que l'Ahr pouvait être activé par les HAP, les PCDD et certains PCB Dioxin-Like, retrouvés en quantité importante dans les PM_{2.5} (Rushmore and Kong, 2002). Cette hypothèse est renforcée par les coefficients de corrélation fortement positifs entre ces deux gènes et les B[a]P-CEC, se traduisant par des niveaux d'induction supérieurs après exposition aux particules de la saison automne-hiver, plus riches en HAP (Gualtieri *et al.*, 2012).

Nous avons évalué le niveau d'expression génique du *CYP2S1*, l'un des CYP les plus récemment décrits et caractérisés, connu pour avoir une localisation principalement extra-hépatique (Rivera *et al.*, 2002; Rylander *et al.*, 2001; Saarikoski *et al.*, 2005). Nous avons pu mettre en évidence une expression forte de ce gène dans les cellules BEAS-2B non-exposées, cohérente avec une autre étude utilisant cette même lignée (Madanayake *et al.*, 2012). Nous avons observé une inhibition de l'expression du *CYP2S1* après exposition aux échantillons de PM_{2.5} dans certaines conditions. Cette observation est en désaccord avec différentes études ayant montré une induction du *CYP2S1* par la TCDD dans les cellules A549 et par le goudron de houille au niveau cutané (Rivera *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003). Cependant, Rivera *et al.* ont montré que la régulation du *CYP2S1* faisait intervenir les éléments de réponse à l'hypoxie contenus dans les XRE du promoteur (Rivera *et al.*, 2007). Ce mécanisme de régulation spécifique pourrait expliquer l'absence d'induction du *CYP2S1* dans des conditions où les *CYP1A1* et *1B1* sont induits par le PCB126 ou la β -naphthoflavone, deux agonistes de l'Ahr (Nannelli *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011a), ainsi que l'absence d'induction du *CYP2S1* malgré des quantités importantes de dioxines et HAP dans certains de nos échantillons. Une autre hypothèse serait liée à la présence d'un inhibiteur non-identifié du *CYP2S1* dont l'action serait compensée par les HAP présents, comme le suggèrent les corrélations positives entre les RQ et les concentrations en HAP. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans l'inhibition du *CYP2S1* restent à élucider.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du gène codant pour la NQO1, impliquée dans la réduction des quinones (Nioi and Hayes, 2004; Ross, 2004). Nous avons mis en évidence une induction retardée du *NQO1*, cohérente avec l'étude de Dieme *et al.* qui a montré que ce gène pouvait être induit dans des cellules BEAS-2B exposées à des échantillons de PM_{2.5} (Dieme *et al.*, 2012). Cette induction est généralement liée à la présence de HAP, et en particulier de B[a]P, bien que cette relation ne soit pas retrouvée dans nos résultats (Hockley *et al.*, 2007; Szafer *et al.*, 2008; Vondráček *et al.*, 2009). Néanmoins, la régulation de l'expression génique de la NQO1 semble impliquer à la fois la voie de l'Ahr et les ARE (Jaiswal, 2000; Nebert *et al.*, 2000), ce qui pourrait expliquer l'absence de corrélation avec les B[a]P-CEC ou les concentrations en HAP après 24 h et 48 h d'exposition.

La modulation de l'expression génique des EMX que nous avons observée pourrait avoir des conséquences importantes sur la métabolisation et l'activation métabolique des HAP présents au sein des échantillons de PM_{2.5}. En effet, la surexpression des *CYP1A1* et *CYP1B1* pourrait favoriser la production d'intermédiaires réactifs, tels que des quinones et du BPDE (Castell *et al.*, 2005; Nebert and Dalton, 2006; Shimada, 2006).

Nous avons donc poursuivi notre étude par une mesure de l'activité EROD, afin de déterminer si l'induction des gènes codant pour les CYP1A1 et 1B1 se traduisait par une augmentation de l'activité catalytique de ces EMX (Chahin *et al.*, 2013). Alors que l'activité EROD était indétectable dans les cellules non-exposées, nous avons mis en évidence une forte augmentation de la quantité de résorufine formée après exposition à tous les échantillons de PM_{2.5}. Cet accroissement est cohérent avec l'induction très importante des CYP1A1 et 1B1 observée, ainsi qu'avec de précédentes études ayant montré une augmentation de l'activité EROD dans des cellules exposées à des PM_{2.5} ou à des extraits organiques de PM_{2.5} (Abbas *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2011). En adéquation avec cette observation, l'activité EROD est corrélée aux concentrations en HAP dans les échantillons de PM_{2.5}, expliquant l'effet plus important des particules collectées au cours de la saison automne-hiver. L'activité EROD est également corrélée aux métaux de transition, ce qui pourrait être dû à un mécanisme similaire à l'effet synergique déjà décrit entre le fer et le B[a]P (Garçon *et al.*, 2004). Cette hypothèse est étayée par la présence d'une structure héminique dans les CYP, et pourrait expliquer l'activité EROD supérieure dans les cellules exposées au PM_{2.5} d'origine industrielle, plus riches en métaux.

6. GENOTOXICITE

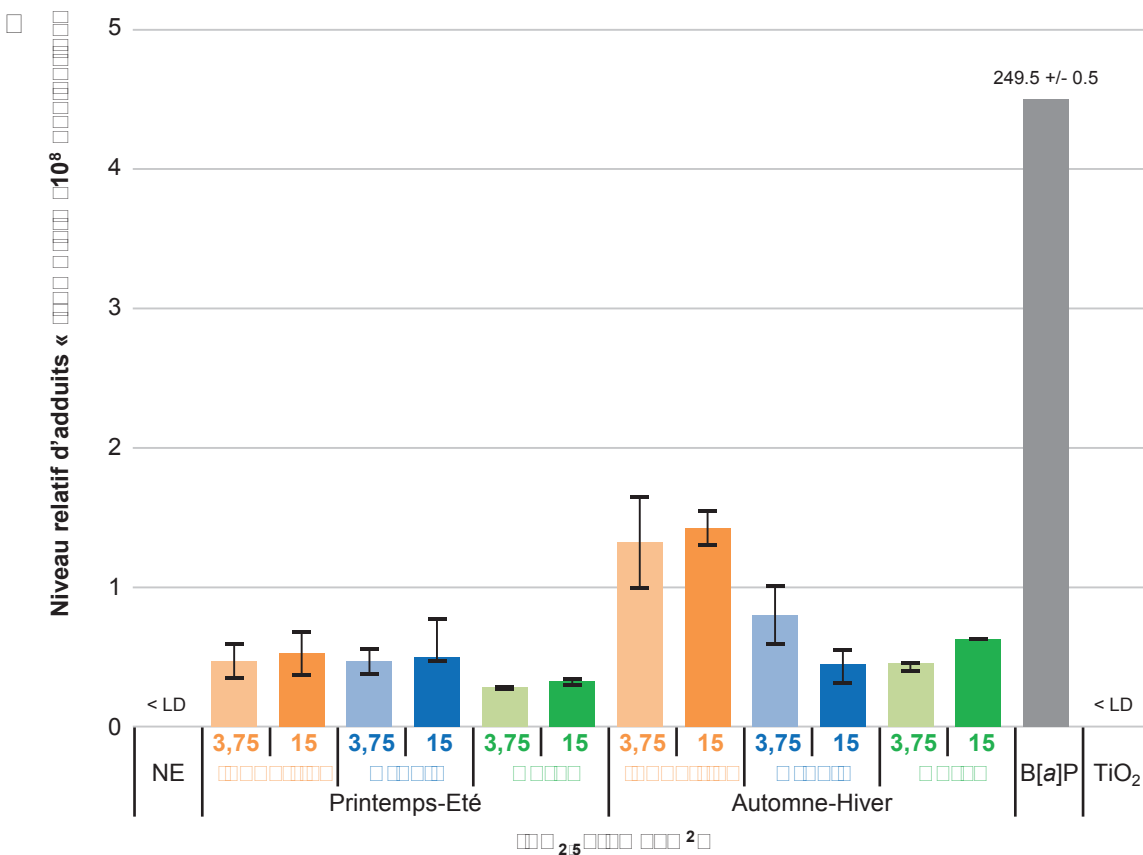
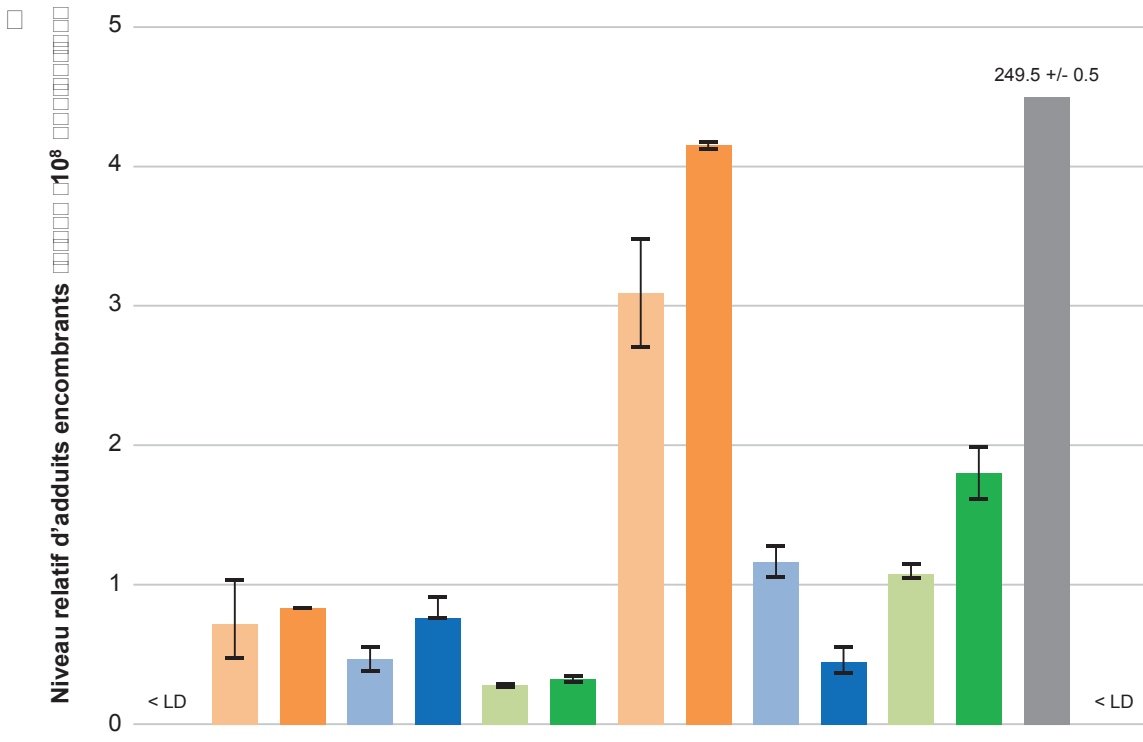
Les échantillons de PM_{2.5} collectés représentent un mélange complexe de composés potentiellement génotoxiques, susceptibles d'induire des lésions de manière directe ou indirecte. Nous nous sommes donc proposés d'étudier, dans les cellules BEAS-2B exposées aux échantillons de PM_{2.5}, la formation d'adduits encombrants à l'ADN, la fragmentation de l'ADN, les anomalies de ségrégation des chromosomes et l'activité télomérase.

6.1. Formation d'adduits encombrants à l'ADN

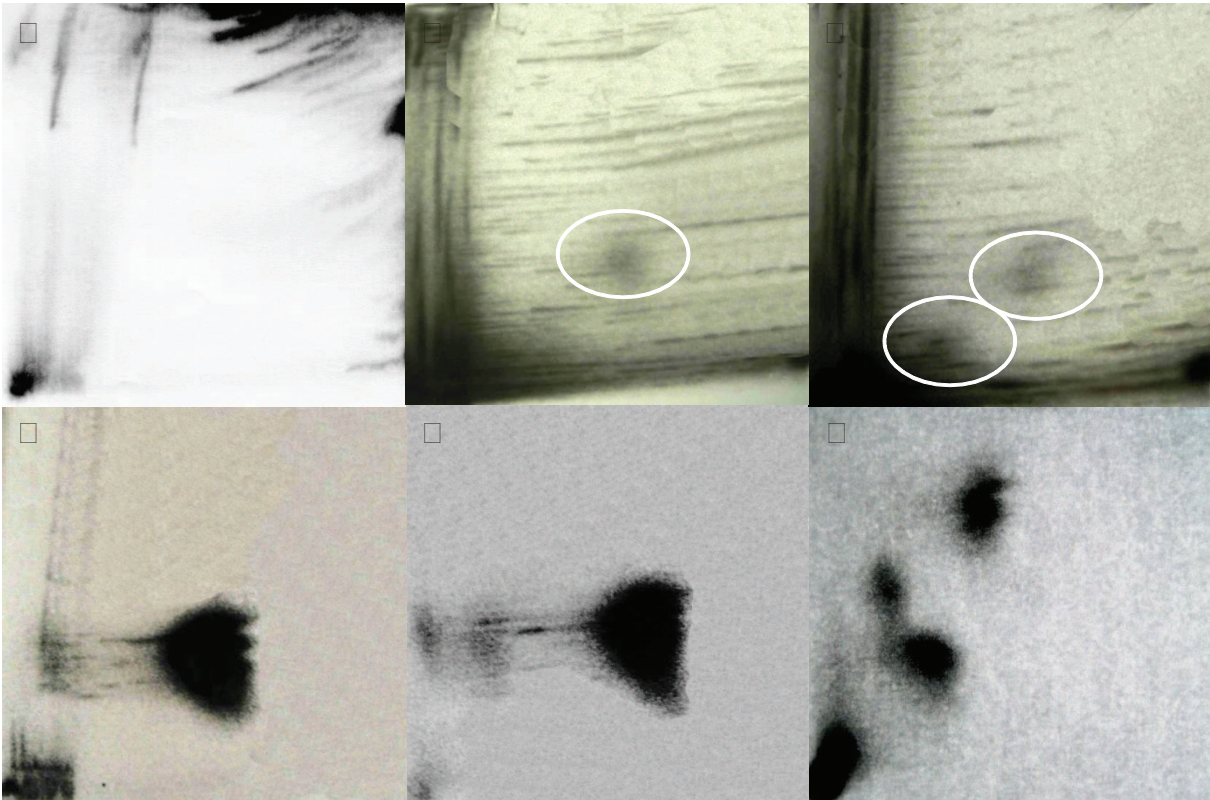
Nous venons de démontrer que les cellules exposées aux échantillons de PM_{2.5} voient l'activité de leurs CYP1A1 et 1B1 augmentée. Vu l'implication de ces enzymes dans l'activation métabolique des HAP en composés réactifs, il apparaît légitime de s'interroger sur les conséquences d'une telle activation sur la formation d'adduits encombrants à l'ADN.

Nous avons donc mesuré la formation d'adduits encombrants à l'ADN dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Des adduits encombrants à l'ADN sont formés dans les cellules exposées aux PM_{2.5}, quels que soient le site, la campagne et la concentration (Figure III.14.A). A l'inverse, aucun adduit n'est détecté dans les cellules non-exposées ni dans les cellules exposées au TiO₂ (Figure III.15.A). Selon les conditions testées, un ou deux spots sont détectés après chromatographie et révélation (Figures III.15.B,C). Le premier spot « type B[a]P » est systématiquement présent et situé en position centrale, superposable au spot généré lors de l'exposition des cellules au B[a]P (1µM, RAL = 249,5.10⁻⁸ nucléotides) ou d'ADN de thymus de veau au BPDE (Figures III.15.D,E). À l'inverse, le second spot n'est pas présent sur toutes les plaques de CCM et se localise à mi-distance entre le point de dépôt et le spot de type B[a]P, avec une migration verticale plus réduite. En prenant en compte les adduits totaux, le niveau relatif d'adduit (RAL) le plus faible a été mesuré dans les cellules exposées aux PM_{2.5} 1R à la concentration la plus faible (RAL = 0,279.10⁻⁸ nucléotides) et le RAL le plus élevé dans la condition 2I2 (4,15.10⁻⁸ nucléotides). Le profil de formation d'adduits de type B[a]P en fonction du site est similaire, avec un RAL minimum mesuré dans la condition 1R1 (RAL = 0,279.10⁻⁸ nucléotides) et un niveau maximum observé pour la condition 2I2 (RAL = 1,425.10⁻⁸ nucléotides) (Figure III.14.B).



14 Niveaux relatifs d'adduits encombrants à l'ADN, totaux (A) ou de « type B[a]P » (B) dans les cellules BEAS-2B exposées ou non (NE) pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm². Médiane [Q1;Q3], n = 2 à 3



15 Profils de migration des nucléotides marqués au ^{32}P , extraits de cellules BEAS-2B non exposées (A), de cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h à des échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ à une concentration de $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ (B,C) ou au benzo[a]pyrène $1\mu\text{M}$ (D), d'ADN de thymus de veau exposé au benzo[a]pyrène-diol-epoxyde (E), ou de *Salmonella typhimurium* (souche YG1041) exposée au 2-nitrofluorène (F).

Qu'il s'agisse du nombre total d'adduits ou des adduits de type B[a]P, le niveau de formation d'adduits encombrants à l'ADN semble suivre une relation dose-réponse, hormis pour l'échantillon 2U.

Concernant les différences observées entre les PM_{2.5} provenant des différents sites, il semble que les particules d'origine industrielle induisent une formation d'adduits encombrants plus importante que les PM_{2.5} urbaines et rurales pour une même campagne de prélèvement.

Enfin, si l'on compare l'influence de la saison de prélèvement, nos résultats montrent une tendance à l'augmentation de la formation d'adduits encombrants à l'ADN dans les cellules exposées aux particules de la seconde campagne, pour un site donné.

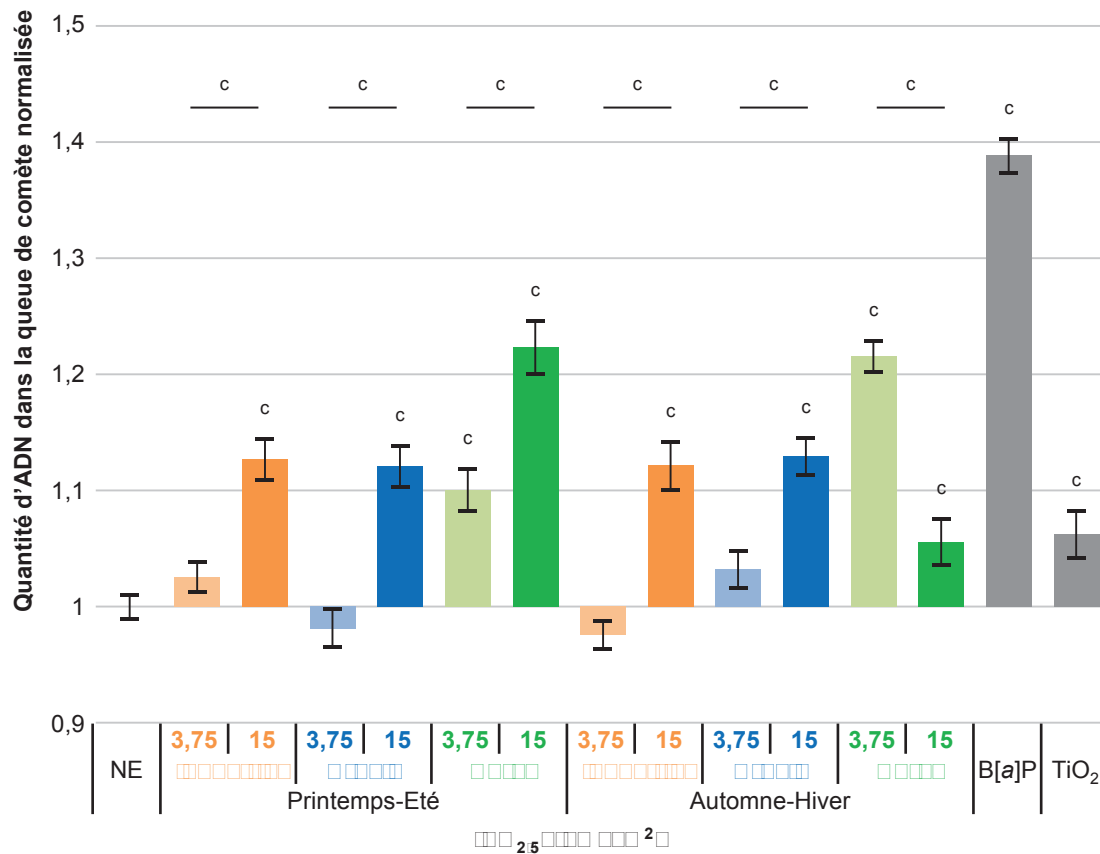
6.2. Fragmentation de l'ADN

La formation d'adduits encombrants n'est pas la seule atteinte primaire à l'ADN pouvant être induite par les agents génotoxiques. Nous avons donc poursuivi notre étude par la recherche de cassures à l'ADN, grâce à deux méthodes de spécificité différente. Nous avons ainsi utilisé le test des comètes, permettant de mettre en évidence les cassures de l'ADN et la formation de sites abasiques, ainsi que la mesure du taux de phosphorylation de H2AX, spécifique des cassures double-brin de l'ADN.

6.2.1. Test des Comètes

Nous avons appliqué le test des comètes aux cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Le pourcentage d'ADN dans la queue de comète est significativement augmenté, par rapport aux cellules non-exposées, dans les cellules exposées aux échantillons de PM_{2.5} à leur concentration la plus forte (106 à 122 %, $p < 0,001$). Des augmentations significatives ont également été mises en évidence après exposition aux échantillons ruraux à une concentration de 3,75 µg / cm² (1R1 = 110 % et 2R1 = 122 %, $p < 0,001$). De même, l'exposition des cellules au B[a]P ou au TiO₂ augmente la proportion d'ADN dans la queue de comète de respectivement 139 % et 106 %. En revanche, la valeur de ce paramètre est similaire dans les cellules non-exposées et dans les cellules exposées dans les conditions 1I1, 1U1, 2I1 et 2U2 (Figure III.16).



□□□□□ □□□□□ 16 □ Pourcentage d'ADN dans la queue de comète, rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), observé après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2,5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Moyenne ± ET, n = 2 expériences x 3 lames x 50 cellules ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : ANOVA et test de Bonferroni

c : P < 0,001

Nous avons étudié l'évolution de la quantité d'ADN dans la queue de comète en fonction de la concentration en PM_{2.5} et mis en évidence une relation dose-réponse significative ($p < 0,001$) pour tous les échantillons, hormis les PM_{2.5} 2R pour lesquelles la relation est inversée.

La comparaison de la réponse biologique en fonction du site de prélèvement met en évidence des effets supérieurs des particules rurales, par rapport aux échantillons urbains et industriels de la même campagne, aux deux concentrations testées pour la première campagne et à la concentration la plus faible pour les particules automne-hiver (Tableau III.19).

Site	3,75		15	
	3,75	15	3,75	15
Site 1 (Orange)	a	ns	c	c
Site 2 (Bleu)			c	c

Site	3,75		15	
	3,75	15	3,75	15
Site 1 (Orange)	c	ns	c	c
Site 2 (Bleu)			c	c

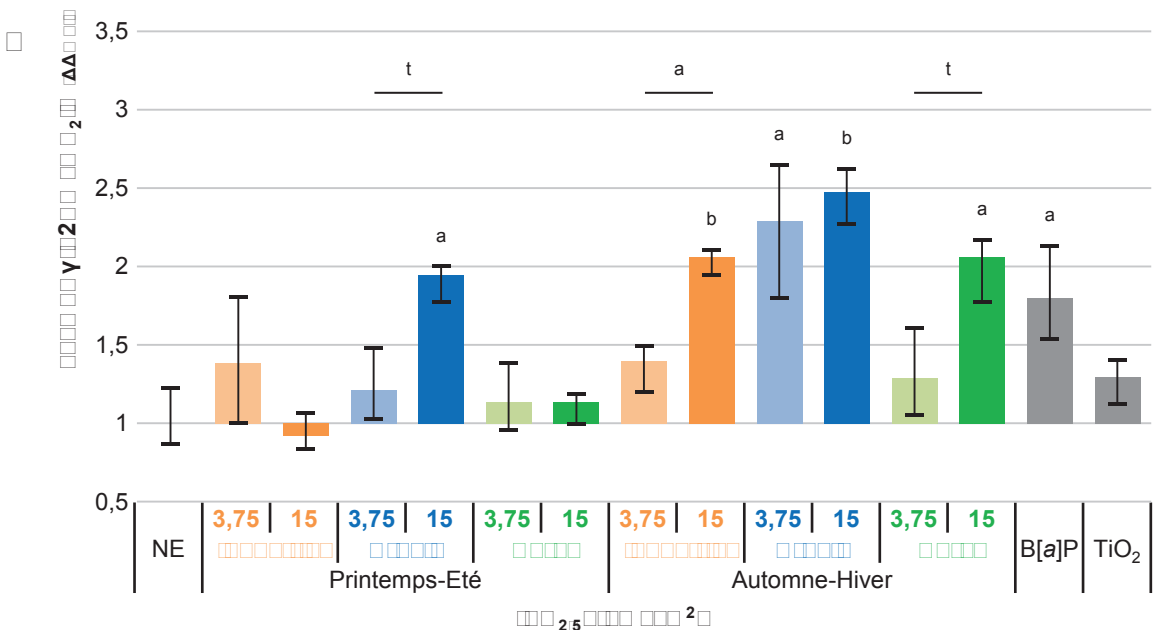
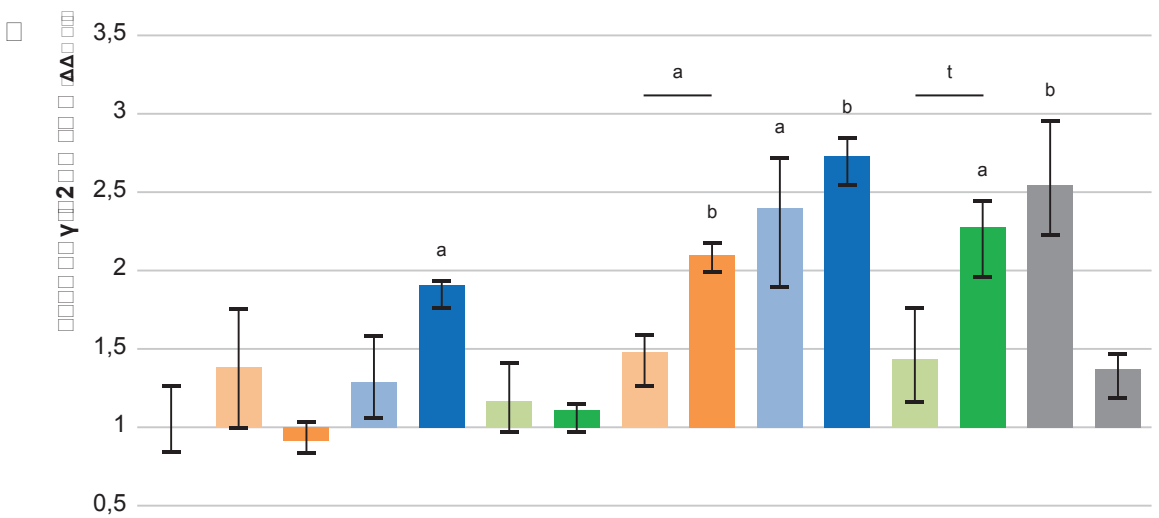
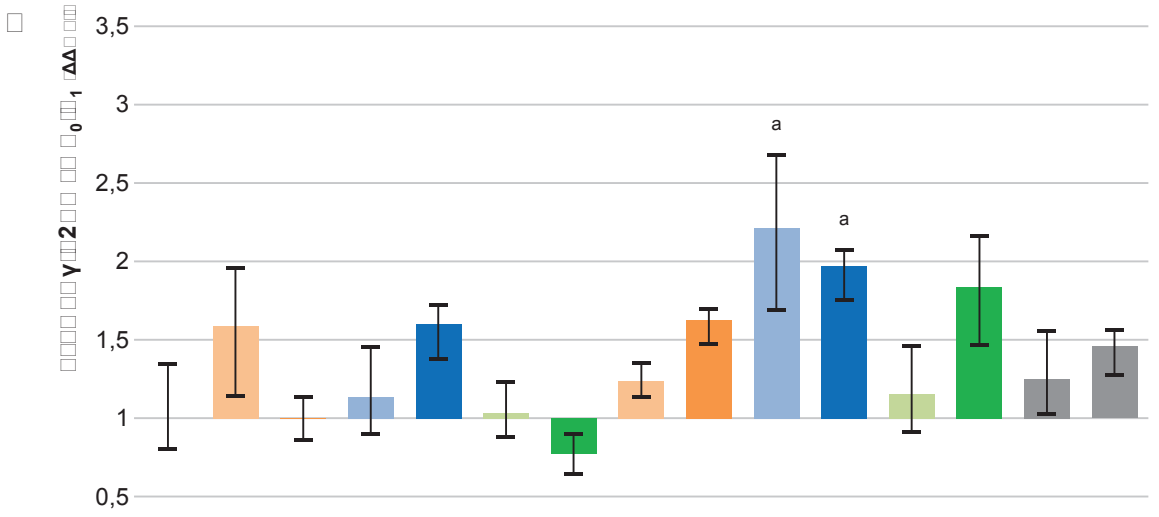
Tableau III.19 : Comparaisons intersites des résultats du test des comètes en réponse aux PM_{2.5}. (ANOVA ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$; c : $p < 0,001$)

Les variations intercampagnes ont également été étudiées, mais ne révèlent pas de tendance nette.

6.2.2. Cassures double-brin

Nous avons poursuivi notre étude par une mesure du taux de phosphorylation de H2AX en fonction des phases du cycle cellulaire dans les cellules exposées dans les mêmes conditions que précédemment.

Nos résultats montrent une augmentation de la quantité de γ -H2AX dans les cellules en phase G₀/G₁ exposées aux PM_{2.5} 2U aux deux concentrations (222 % et 197 % du taux observé dans les cellules non-exposées, $p < 0,05$) (Figure III.17.A). Le nombre de conditions d'exposition induisant des cassures double-brins de l'ADN augmente lorsque les cellules sont en phase S ou G₂/M. Ainsi, le taux de γ -H2AX est significativement supérieur après expositions aux conditions 1U2, 2I2, 2U1/2 et 2R2, avec des $\Delta\Delta$ MF1 toujours supérieures à 190 % ($p < 0,05$) (Figures III.17.B,C). Le TiO₂ ne semble pas induire de cassures double-brin, alors que le B[a]P induit une augmentation du taux de γ -H2AX dans les cellules en phase S ($\Delta\Delta$ MF1 = 255 %, $p < 0,05$) et G₂/M ($\Delta\Delta$ MF1 = 180 %, $p < 0,05$).



Variation ($\Delta\Delta\text{MFI}$) du taux de phosphorylation de H2AX ($\gamma\text{-H2AX}$), par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 72 h aux échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, en fonction des phases du cycle cellulaire G_0/G_1 (A), S (B) ou G_2/M (C).
 Médiane [Q1;Q3], $n = 4$; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 t : tendance $P < 0,1$; a : $P < 0,05$; b : $P < 0,01$

Lorsqu'il existe une réponse significative, l'évolution du taux de γ -H2AX suit une relation dose-réponse pour les échantillons 2I ($p < 0,05$) et 2R (tendance, $p < 0,10$), mais pas pour l'échantillon 2U.

Comme pour les autres tests, nous avons étudié l'impact du site de prélèvement sur la réponse biologique. Les différences significatives montrent des effets plus marqués des échantillons urbains, par rapport aux autres échantillons de la même campagne pour une concentration donnée (Tableau III.20).

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		t		ns
3,75			ns	
15				a

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		a		ns
3,75			ns	
15				a

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		a		ns
3,75			ns	
15				a

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		ns		ns
3,75			t	
15				t

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		a		ns
3,75			ns	
15				a

γ -H2AX	3,75	15	3,75	15
3,75	ns		ns	
15		ns		ns
3,75			t	
15				ns

Tableau III.20 : Comparaisons intersites du taux de γ -H2AX en réponse aux $PM_{2.5}$.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; t : tendance $p < 0,1$; a : $p < 0,05$)

La campagne de prélèvement a également un effet sur le taux de phosphorylation de γ -H2AX induit par les $PM_{2.5}$. En effet, les particules collectées au cours de la saison automne-hiver conduisent à un niveau de réponse plus important que les $PM_{2.5}$ correspondantes de la saison printemps-été, particulièrement à la concentration $15 \mu g / cm^2$ (Tableau III.21).

La dernière série de comparaisons que nous avons effectuée concerne la réponse des cellules selon les phases du cycle cellulaire pour une condition d'exposition donnée. Les résultats obtenus pour chaque prélèvement sont similaires entre les cellules en phase S et G_2/M . Il existe cependant quelques différences significatives, observées entre les cellules en G_0/G_1 et les cellules en phase S exposées aux $PM_{2.5}$ 2I2 ou 2U2 ($p < 0,05$).

γ -H2AX		3,75 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$		15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$	
		AH/PE	<i>p</i>	AH/PE	<i>p</i>
□□□□□□□□	G ₀ /G ₁	0,78	ns	1,63	a
	S	1,07	ns	2,28	a
	G ₂ /M	1,01	ns	2,24	a
□□□□□□	G ₀ /G ₁	1,95	ns	1,23	ns
	S	1,86	t	1,43	a
	G ₂ /M	1,89	t	1,27	t
□□□□□	G ₀ /G ₁	1,12	ns	2,38	a
	S	1,22	ns	2,06	a
	G ₂ /M	1,13	ns	1,82	ns

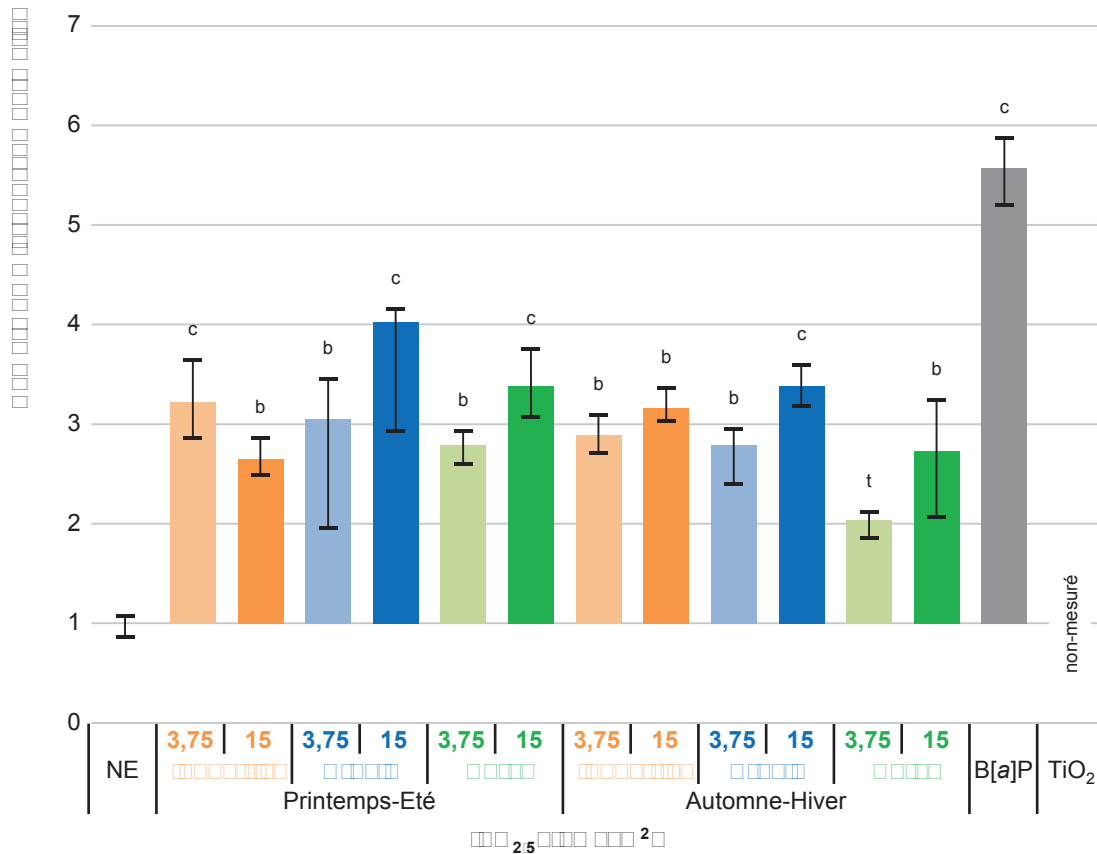
Tableau III.21 : Comparaisons intercampagnes du taux de γ -H2AX en réponse aux PM_{2.5}.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; t : tendance $p < 0,1$; a : $p < 0,05$)

6.3. Anomalies de ségrégation des chromosomes

Les lésions primaires de l'ADN que nous venons de décrire peuvent avoir des conséquences au niveau chromosomique qu'il convient de prendre en compte. Nous avons ainsi évalué les effets clastogènes et/ou aneugènes des échantillons de PM_{2.5} grâce au test des micronoyaux, réalisé sur des cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

Le dénombrement des micronoyaux met en évidence une augmentation significative du nombre de micronoyaux / 1 000 cellules mononuclées exposées aux échantillons de PM_{2.5}, par rapport aux cellules non-exposées (Figure III.18). Celui-ci est compris entre 19 et 37,5 / 1 000 cellules exposées respectivement aux échantillons 2R1 et 1U2, contre 9,33 / 1 000 cellules non-exposées ($p < 0,01$ pour toutes les conditions, sauf 1R1 : tendance $p < 0,1$). Une augmentation de la proportion de cellules présentant un micronoyau est également observée après exposition au B[a]P (52 / 1 000, $p < 0,001$). La réponse après exposition au TiO₂ n'a pas pu être mesurée pour des raisons techniques.

L'analyse statistique que nous avons réalisée ne permet pas de mettre en évidence de différence entre les différents prélèvements de PM_{2.5}, que ce soit du point de vue de l'effet dose, site ou campagne. Néanmoins, la tendance semble être à une relation dose-réponse, sauf pour le prélèvement 1I.



□□□□□□ □□18 □ Nombre de micronoyaux pour 1000 cellules mononucléées, rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), observé après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2,5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 2 x 2 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests du χ²

t : tendance P < 0,1 ; b : P < 0,01 ; c : P < 0,001


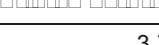

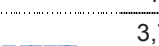
6.4. Activité télomérase

Les effets génotoxiques que nous venons de mettre en évidence pourraient avoir un effet sur l'initiation d'un processus tumoral. Cependant, la cancérogenèse est un phénomène multi-étapes, qui implique une phase de promotion favorisant la prolifération des cellules initiées. Nous avons donc terminé notre étude de génotoxicité par une mesure de l'activité télomérase dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Nos résultats montrent une diminution 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 représente 52 % (2R1) à 77 % (2U1) de celle mesurée dans les cellules non-exposées ($p < 0,01$). De manière intéressante, l'activité télomérase réaugmente lorsque la concentration en PM_{2.5} passe à 15 µg / cm², pour être comprise entre 73 % (1I2) et 126 % (2R2) de l'activité mesurée dans les cellules non-exposées (Figure III.19). A la concentration la plus forte, certains échantillons de PM_{2.5} induisent donc une diminution significative de l'activité télomérase (1I2, 1U2 et 2I2, $p < 0,01$), alors que d'autres conduisent à une augmentation de cette activité (2U2, tendance $p < 0,10$; 2R2, $p < 0,001$). Les expositions au B[a]P et au TiO₂ conduisent quant à elles à une inhibition significative de l'activité télomérase ($p < 0,001$).

Il existe des différences significatives entre les effets observés aux deux concentrations pour tous les échantillons (sauf pour les PM_{2.5} 1I) qui vont systématiquement dans le sens d'une augmentation de l'activité télomérase lorsque la concentration en PM_{2.5} augmente ($p < 0,01$).

Les variations intersites sont à interpréter en fonction de la concentration. Ainsi, à la concentration la plus faible (3,75 µg / cm²), les PM_{2.5} d'origine rurale sont celles qui réduisent le plus l'activité télomérase. A une concentration de 15 µg / cm², ce sont les PM_{2.5} rurales qui induisent la réaugmentation la plus forte, alors que les particules industrielles sont celles qui inhibent le plus fortement l'activité télomérase (Tableau III.22).

		3,75	15	3,75	15
					
					
	3,75	b		a	
	15		ns		c
	3,75			ns	
	15				b




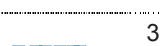
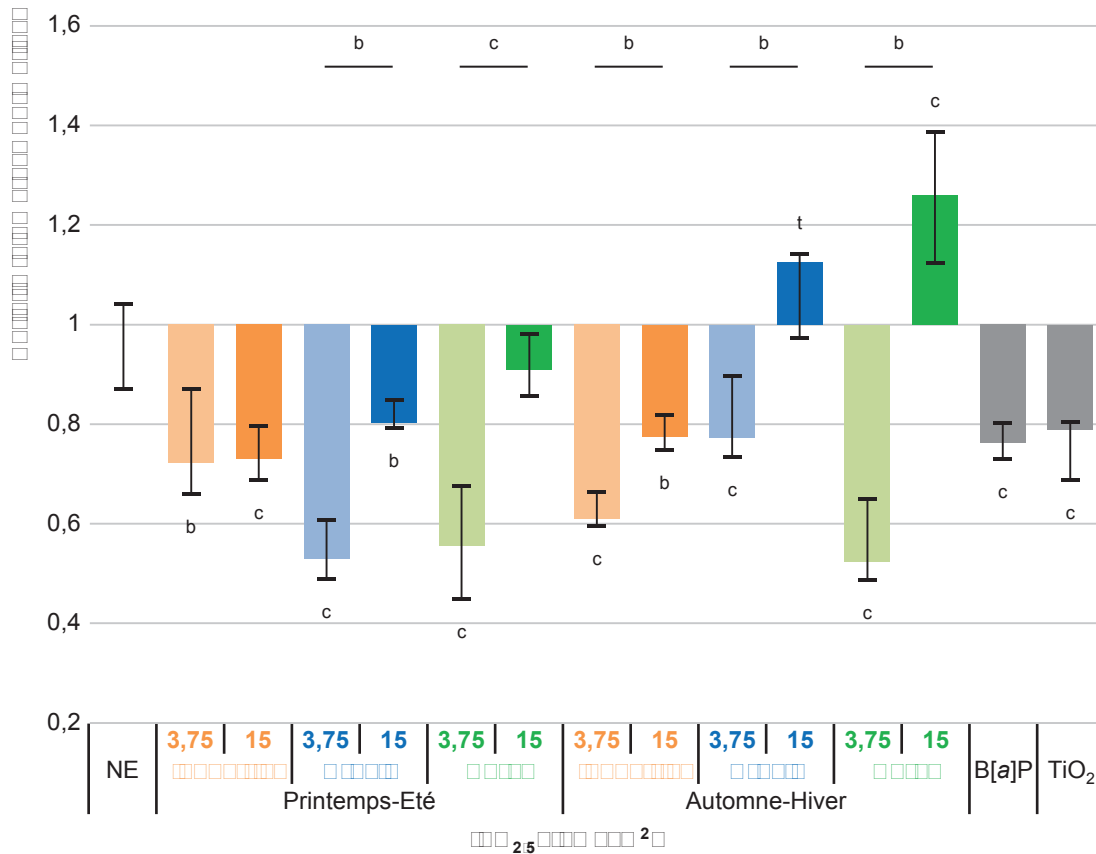
		3,75	15	3,75	15
					
					
	3,75	a		a	
	15		c		b
	3,75			b	
	15				ns

Tableau III.22 : Comparaisons intersites de l'activité télomérase en réponse aux PM_{2.5}.
(Test U de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$; b : $p < 0,01$; c : $p < 0,001$)



☐☐☐☐☐ ☐☐☐☐☐ 19 ☐ Activité télomérase, rapportée aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), mesurée après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2,5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney

t : tendance P < 0,1 ; b : P < 0,01 ; c : P < 0,001

Nous avons également comparé l'influence de la saison de prélèvement, sans pouvoir mettre en évidence d'effet clair sur l'activité télomérase. Il semblerait cependant que les particules collectées au cours de la saison automne-hiver induisent les écarts de réponse les plus importants entre les concentrations.

6.5. Corrélation avec la composition des PM_{2.5}

Nous avons évalué les corrélations entre la composition chimique des échantillons de PM_{2.5} et leurs effets génotoxiques. (Tableau III.23). La formation d'adduits encombrants, la réponse en test des comètes (hors échantillon 2R2) et le taux de γ -H2AX semblent liés à la concentration en HAP et/ou aux B[a]P-CEC dans les échantillons de PM_{2.5}. A l'inverse, le taux de micronoyaux est corrélé à la quantité de métaux, et particulièrement de métaux de transition. Enfin, les corrélations entre l'activité télomérase et la composition chimique dépendent de la concentration en PM_{2.5}.

		Métaux Transition	Autres Métaux	HAP	B[a]P-CEC
Adduits encombrants	type B[a]P	0,206	-0,093	0,161	0,162
	totaux	0,072	-0,203	0,389	0,403
Comètes		0,245	0,294	0,531	0,420
Comètes (hors 2R2)		0,182	0,291	0,682	0,564
γ -H2AX	G0/G1	0,068	-0,196	0,245	0,295
	S	0,078	-0,256	0,442	0,570
	G2/M	0,139	-0,188	0,378	0,473
	total	0,087	0,210	0,351	0,444
Micronoyaux		0,412	0,266	0,072	-0,007
3,75 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$		0,349	-0,099	0,271	-0,048
Télomérases	15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$	0,793	0,515	0,391	0,708
	total	0,424	0,322	0,617	0,549




Tableau III.23 : Corrélations entre la composition des PM_{2.5} et les paramètres de génotoxicité. les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives (ρ de Spearman, $p < 0,05$)

6.6. Discussion

La cancérogénèse est un processus multi-étapes, dont les stades d'initiation et de promotion impliquent en partie des lésions génotoxiques directes et indirectes. Nous nous sommes donc proposés d'étudier différents mécanismes de génotoxicité, grâce à l'utilisation de tests reconnus et standardisés (dosage d'adduits encombrants, test des comètes, test

des micronoyaux) et de test plus novateurs, tels que le dosage de γ -H2AX et de l'activité télomérases.

Le dosage des adduits encombrants par post-marquage au ^{32}P a ainsi mis en évidence la formation d'adduits à l'ADN des cellules BEAS-2B exposées aux $\text{PM}_{2.5}$, avec un effet dose vraisemblable pour tous les échantillons hormis le prélèvement 2U. Cette inversion dans l'intensité des effets en fonction de la concentration en $\text{PM}_{2.5}$ 2U pourrait s'expliquer par un éventuel biais de manipulation lors de l'exposition des cellules et/ou d'une mortalité sélective des cellules les plus touchées. La détection d'adduits encombrants à l'ADN de cellules exposées à des $\text{PM}_{2.5}$ est en accord avec des résultats similaires obtenus dans d'autres types cellulaires exposés à des particules de même type (Abbas *et al.*, 2013; Billet *et al.*, 2008). La présence d'adduits encombrants confirme la biodisponibilité des HAP, ainsi que les capacités de la lignée cellulaire BEAS-2B à transformer les HAP en métabolites réactifs, hypothèse supportée par l'activité EROD mesurée, également démontrée par Uppstad *et al.* (Uppstad *et al.*, 2010).

Selon les conditions d'exposition, un ou deux spots ont pu être observés sur les plaques de CCM. Un premier spot « type B[a]P », superposable à celui retrouvé dans l'ADN des cellules exposées au B[a]P seul et dans l'ADN de thymus de veau exposé au BPDE, est systématiquement observé après exposition des cellules aux $\text{PM}_{2.5}$. Bien que l'intensité de ce spot ne soit pas corrélée à la concentration en HAP, elle est fortement associée à l'activité EROD globale mesurée dans les cellules ($\rho = 0,734$, $p < 0,01$). Ces observations suggèrent donc que ce spot traduit la présence de nucléotides modifiés par le BPDE dans l'ADN des cellules exposées aux $\text{PM}_{2.5}$. Le second spot est localisé à mi-distance entre le point de dépôt et le spot de type B[a]P. Cette localisation laisse supposer qu'il pourrait être formé par des adduits issus de composés nitro-aromatiques, comme le montre le profil de migration obtenu à partir d'ADN de *Salmonella typhimurium* exposé au 2-nitrofluorène (Figure III.15.F), ainsi qu'une étude ayant analysé la formation d'adduits encombrants de composés nitro-aromatiques à l'ADN des cellules BEAS-2B (Ovrevik *et al.*, 2010).

L'ensemble des résultats obtenus par la méthode de post-marquage au ^{32}P suggère que l'exposition de cellules BEAS-2B aux échantillons de $\text{PM}_{2.5}$ collectées conduit à la formation d'adduits encombrants à l'ADN liée à la fois à la présence de HAP et d'autres composés organiques, tels que les nitro-aromatiques.

L'étape suivante de notre analyse a consisté à étudier les cassures à l'ADN potentiellement induites par l'exposition des cellules BEAS-2B aux $\text{PM}_{2.5}$. Pour ce faire, nous avons en premier lieu utilisé le test des comètes, permettant de mettre en évidence les cassures simples et double-brin, ainsi que la formation de sites abasiques (Collins *et al.*, 2008). Les résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation significative du

pourcentage d'ADN dans la queue de comète après exposition à tous les échantillons de PM_{2.5}. Cette observation est en adéquation avec de précédentes études publiées sur différents échantillons de PM et modèles cellulaires (Bonetta *et al.*, 2009; Perrone *et al.*, 2010). Nous avons également montré une augmentation de la fragmentation de l'ADN en réponse au B[a]P et, dans une moindre mesure, au TiO₂, tel que précédemment démontré (Falck *et al.*, 2009; Gabelova *et al.*, 2007). De plus, nous avons observé la présence de particules au niveau de noyaux fortement endommagés, comme l'ont déjà décrit Karlsson *et al.*, suggérant la possibilité d'une interaction directe entre les particules et l'ADN (Karlsson *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données laisse supposer que les fractions inorganiques et organiques pourraient jouer un rôle dans les cassures de l'ADN, même si les coefficients de corrélations calculés ici mettent essentiellement en avant le rôle des HAP (Knaapen *et al.*, 2002; Meng and Zhang, 2007).

Pour mieux comprendre l'origine et les mécanismes des lésions précédemment décrites, nous avons poursuivi notre étude par une mesure spécifique des cassures double-brin. Nous avons ainsi mesuré le taux de phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139, connue pour être liée à l'apparition de cassures double-brin (Rogakou *et al.*, 1998). Les niveaux de γ -H2AX supérieurs dans les cellules en phase S ou G₂/M laissent supposer que l'apparition de cassures double-brin serait majoritairement liée à la réplication (Gagou *et al.*, 2010). Concernant les composés chimiques responsables de ces lésions, des effets supérieurs observés après exposition aux PM_{2.5} collectées au cours de la saison automne-hiver ont déjà été mis en évidence par Longhin *et al.* (Longhin *et al.*, 2013). Cette observation, associée aux coefficients de corrélation très importants avec les concentrations en HAP et les B[a]P-CEC suggèrent que ces cassures double-brin seraient majoritairement dues à la fraction organique des PM_{2.5}. Cette hypothèse est renforcée par la capacité du B[a]P à induire une phosphorylation de H2AX, également démontrée par Toyooka *et al.* (Toyooka *et al.*, 2008). A l'inverse, l'absence d'augmentation du taux de γ -H2AX dans les cellules exposées aux PM_{2.5} d'origine industrielle étaye l'idée d'une contribution réduite des métaux à la formation de cassures double-brin.

Les résultats issus du test des comètes et de la mesure de γ -H2AX en cytométrie en flux suggèrent donc que la fraction inorganique induirait des cassures simple-brin et des sites abasiques qui seraient rapidement réparés, empêchant l'apparition de cassures double-brins associées à la réplication. Ces dommages seraient probablement dus à la formation d'espèces oxydantes (Karlsson *et al.*, 2004; Risom *et al.*, 2005). A l'inverse, la fraction organique serait à l'origine de cassures double-brin, vraisemblablement produites lors de la réplication à partir de cassures simple-brin non réparées.

A l'interface entre mécanismes de génotoxicité directe et indirecte, la formation de micronoyaux peut avoir pour origine l'exposition à des agents clastogènes ou aneugènes (Kirsch-Volders *et al.*, 2011). Ces structures sont constituées d'un chromosome ou d'un fragment de chromosome présent dans le cytoplasme et indépendant du noyau, issu d'un défaut de ségrégation lors de la mitose. Notre étude a mis en évidence une augmentation significative de la formation de micronoyaux dans les cellules exposées aux PM_{2.5} à une concentration de 15 µg / cm². Un effet positif des particules sur la formation de micronoyaux a déjà été démontré (Poma *et al.*, 2002, 2006). Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les échantillons, mais l'étude des corrélations avec les composés contenus dans les particules suggère une implication importante des métaux, en particulier de transition. L'influence de la fraction organique n'est cependant pas à exclure, considérant la forte induction de micronoyaux suite à l'exposition au B[a]P seul et vues les conclusions d'une précédente étude ayant établi un lien entre la formation de micronoyaux d'une part, et l'exposition au cadmium ou aux HAP d'autre part (Roubicek *et al.*, 2007). L'absence de corrélation entre le nombre de micronoyaux et le taux de γ-H2AX ($\rho = 0,144 - 0,260$ selon la phase du cycle ; $p > 0,4$), suggère que les mécanismes de formation des micronoyaux n'ont pas pour seule cause les cassures double-brin précédemment décrites. Cependant, le protocole que nous avons employé ne permet pas la distinction entre les effets des agents aneugènes et clastogènes, qui nécessiterait une adaptation selon le protocole décrit par Mateuca *et al.* (Mateuca *et al.*, 2006).

Pour compléter notre étude des effets génotoxiques indirects, nous nous sommes intéressés à l'activité télomérase dans les cellules exposées aux PM_{2.5}. En effet, la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique permettant le maintien des télomères, dont la diminution d'activité est associée à une instabilité génomique dans différents cancers (Young, 2010). Nos résultats ont montré que l'activité télomérase était significativement réduite dans les cellules exposées aux PM_{2.5} à la concentration la plus faible. De manière surprenante, nous avons observé une réaugmentation de l'activité télomérase dans les cellules exposées aux mêmes échantillons mais à une concentration plus importante. Ceci pourrait être lié à une destruction sélective des cellules dont l'activité télomérase était fortement réduite, probablement due à l'extrême instabilité génomique décrite engendrée par le dysfonctionnement des télomères (Frias *et al.*, 2012). Néanmoins, l'activité télomérase demeurait, dans la plupart des cellules exposées à 15 µg / cm² de PM_{2.5}, inférieure à celle mesurée dans les cellules non-exposées. Cette observation pourrait avoir une incidence importante sur le potentiel cancérigène des particules, car une étude récente a montré qu'une activité télomérase réduite était associée à un risque plus important de cancer pulmonaire (Jeon *et al.*, 2012). Ceci est vraisemblablement dû au fait que la perte des

télomères conduit à une tétraploïdisation des cellules et une instabilité génomique caractéristiques des cancers épithéliaux (Pereira and Ferreira, 2013). Concernant le lien entre modulation de l'activité télomérase et composition chimique des $PM_{2.5}$, une étude a souligné le lien entre le stress oxydant induit par les particules et l'érosion des télomères (Grahame and Schlesinger, 2012). Ce mécanisme pourrait expliquer la forte corrélation négative retrouvée entre la concentration en métaux de transition et l'activité télomérase dans notre étude. L'ensemble de ces données souligne la nécessité d'étudier plus en détails les conséquences de l'exposition des $PM_{2.5}$ sur l'activité télomérase. Il conviendrait également de compléter cette étude par une mesure de la longueur des télomères dans les cellules exposées et de l'évolution de l'activité télomérase au cours du temps. De même, l'implication des différentes familles chimiques sur cette activité serait à préciser.

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 la composition chimique influence la nature des effets génotoxiques induits, comme le montrent les différences de résultats entre les échantillons. Enfin, notre étude souligne la nécessité d'associer différentes méthodes lors de l'évaluation de la génotoxicité d'un composé, et à fortiori d'un mélange de composés. En effet, les effets génotoxiques peuvent impliquer à la fois des mécanismes directs, tels que des adduits et cassures, et indirects, comme un dysfonctionnement du fuseau mitotique ou des télomérases.

7. MODIFICATIONS EPIGENETIQUES

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.

7.1. Méthylation de l'ADN

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 cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

7.1.1. Promoteur de *P16^{INK4A}*

Le ratio normalisé $ADN_{\text{méthylé}} / ADN_{\text{non-méthylé}}$ est assez variable dans les cellules non-exposées (Q1 = 0,23 ; Q3 = 1,79) (Figure III.20). Nos résultats mettent cependant en évidence une augmentation significative du taux de méthylation du promoteur de *P16^{INK4A}* dans les cellules exposées aux échantillons 1I (RQ = 6,07 ; $p < 0,01$), 2I (RQ = 2,61 ; $p < 0,05$) et 2R (RQ = 2,05 ; $p < 0,05$) à la concentration la plus faible ($p < 0,05$). Nos observations montrent également une inhibition significative du ratio $ADN_{\text{méthylé}} / ADN_{\text{non-méthylé}}$ dans les cellules exposées au PM_{2.5} 2U à une concentration de 15 µg / cm² (RQ = 0,16 ; $p < 0,05$). L'exposition des cellules au B[a]P ne modifie pas significativement le niveau de méthylation du promoteur de *P16^{INK4A}*, alors que les cellules exposées au TiO₂ présentent un taux de méthylation plus important que les cellules non-exposées (RQ = 2,85 ; $p < 0,01$).

Il existe des différences entre les réponses cellulaires aux PM_{2.5} à 3,15 et 15 µg / cm². En effet, nous observons pour la majorité des échantillons une diminution du taux de méthylation lorsque la concentration augmente. Cette diminution est significative pour les échantillons 1I, 1U et 2U ($p < 0,05$) et apparaît comme une tendance pour les échantillons

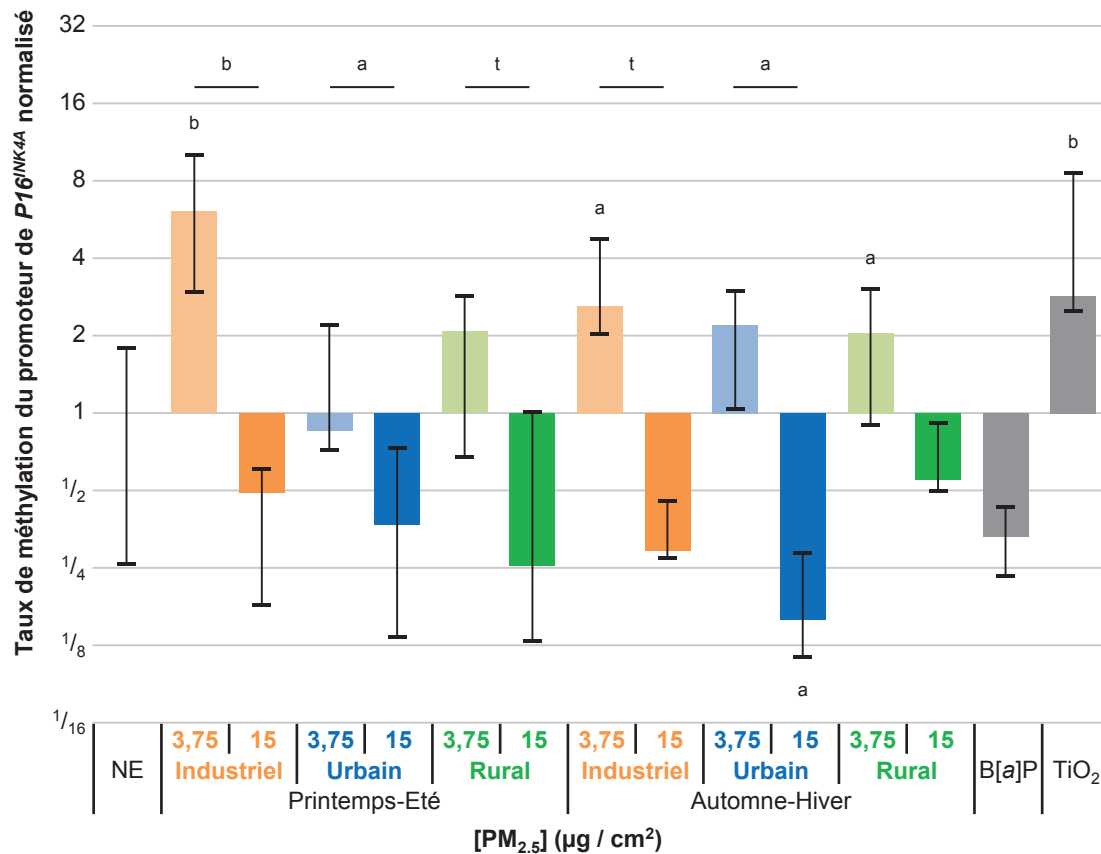


Figure III.20 : Taux de méthylation du promoteur de $P16^{INK4A}$, rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), observé après exposition pendant 72 h aux échantillons de $PM_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

Médiane [Q1;Q3], $n = 4$; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 t : tendance $P < 0,1$; a : $P < 0,05$; b : $P < 0,01$

1R et 2I ($p < 0,1$). La variation observée pour l'échantillon 2R, bien que non significative, va également dans le sens d'une réduction du taux de méthylation ($RQ_{3,75} / RQ_{15} = 3,7$).

Comme pour les tests précédents, nous avons comparé les effets des particules selon leur site et leur saison de prélèvement. Les comparaisons intersites mettent en évidence un effet supérieur des particules 1I à la concentration la plus faible, par rapport aux échantillons 1U et 1R à la même concentration ($p < 0,05$). Il existe également un effet plus marqué des particules 2U ($15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) par rapport aux $\text{PM}_{2,5}$ 2R ($p < 0,05$).

La campagne de prélèvement n'a quant à elle pas d'incidence significative sur le taux de méthylation du promoteur de $P16^{\text{INK4A}}$, pour un site de prélèvement et une concentration donnés.

7.1.2. Promoteur de *MGMT*

Nous avons ensuite étudié le niveau de méthylation du promoteur de *MGMT*. Nos résultats montrent, comme précédemment, un niveau de méthylation de base assez variable ($Q1 = 0,75$; $Q3 = 3,81$) (Figure III.21). Les variations du taux de méthylation du promoteur de *MGMT* dans les cellules exposées aux $\text{PM}_{2,5}$ sont quant à elles beaucoup plus faibles que celles observées pour le promoteur de $P16^{\text{INK4A}}$. En effet, seules les particules 1I à la concentration la plus faible semblent induire une légère augmentation du ratio $\text{ADN}_{\text{méthylé}} / \text{ADN}_{\text{non-méthylé}}$ ($RQ = 3,74$; $p < 0,1$). A l'inverse, les particules 2I à une concentration de $15 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ pourraient provoquer une faible diminution du taux de méthylation du promoteur de *MGMT* ($RQ = 0,51$; $p < 0,1$). Comme précédemment, l'exposition des cellules au B[a]P ne modifie pas le taux de méthylation du promoteur du gène, alors que le TiO_2 semble en provoquer une légère augmentation ($RQ = 2,22$; $p < 0,1$).

Le sens de variation en fonction de la dose de $\text{PM}_{2,5}$ n'est pas très net, mais pourrait conduire à une hypométhylation du promoteur lorsque la concentration en $\text{PM}_{2,5}$ augmente. Ainsi, il existe une tendance à la diminution entre les conditions 1I1 et 1I2 ($RQ_{3,75} / RQ_{15} = 1,4$; $P < 0,1$).

Les comparaisons intersites et intercampagnes ne mettent en évidence que peu de différences significatives. En effet, seules une tendance à l'hyperméthylation du promoteur de *MGMT* induite par les particules 1I par rapport aux particules 1U ($p < 0,1$) et 1R ($p < 0,05$) à la concentration la plus faible, ainsi qu'une hypométhylation potentielle dans la condition 2I2 par rapport aux conditions 2U2 et 1I2 ($p < 0,1$), ont été détectées.

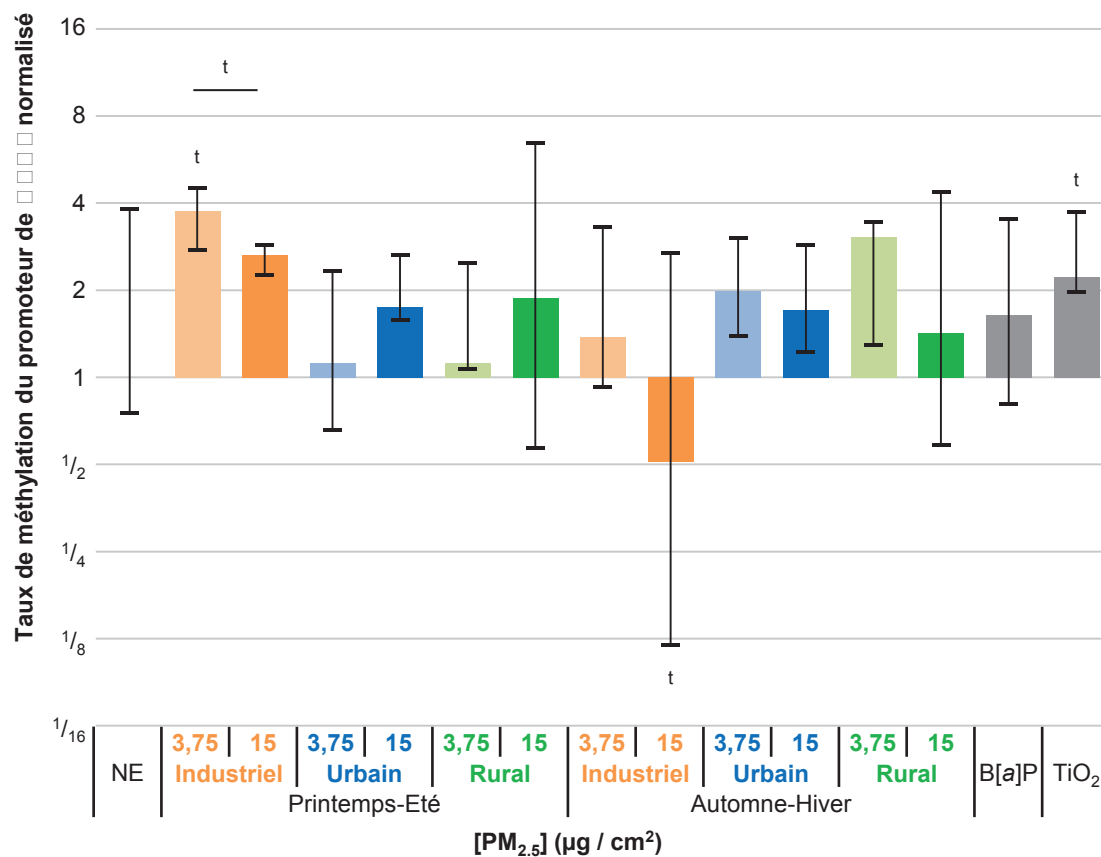


Figure III.21 : Taux de méthylation du promoteur de *MGMT*, rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), observé après exposition pendant 72 h aux échantillons de $PM_{2,5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

Médiane [Q1;Q3], $n = 4$; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney

t : tendance $P < 0,1$

7.2. Modifications post-traductionnelles de l'histone 3

Après avoir étudié le niveau de méthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$, nous nous sommes intéressés à un autre mécanisme épigénétique en étudiant deux modifications post-traductionnelles de l'histone 3.

Nous avons ainsi quantifié les taux d'acétylation de la lysine 18 (K18ac) et de diméthylation de la lysine 4 (K4me2) de l'histone 3 (H3), dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de $PM_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$.

7.2.1. H3K18ac

La quantification de H3K18ac met en évidence une forte diminution du taux d'acétylation dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ par rapport aux cellules non-exposées (Figure III.22). En effet, le rapport H3K18ac / H3 total est très significativement réduit dans la quasi-totalité des conditions testées, hormis 1R1. Le taux de K18 acétylée est ainsi inférieur à 30 % de celui observé dans les cellules non-exposées pour les conditions 112 (29 %), 1U2 (22 %), 211 (17 %), 2U1 (22 %) et 2R2 (24 %) ($p < 0,01$). L'exposition des cellules au B[a]P et au TiO_2 réduisent également le taux d'acétylation de H3K18, avec des valeurs respectives de 34 % et 45 % ($p < 0,01$).

Il n'existe pas de différence significative entre les effets induits par les $PM_{2.5}$ à une concentration de 3,75 ou de 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. De même, l'amplitude des effets est, d'un point de vue statistique, similaire quel que soit le site de prélèvement.

Enfin, nous avons étudié les variations d'une campagne de prélèvement à l'autre, sans pouvoir mettre en évidence de différence significative entre les effets observés sur le taux de H3K18ac. Néanmoins, les particules collectées au cours de la saison printemps-été, lorsque les cellules sont exposées à une concentration de 15 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, semblent avoir un effet plus important que la réduction de l'acétylation en K18 que les particules correspondantes collectées lors de la campagne automne-hiver ($p < 0,1$).

7.2.2. H3K4me2

Nous avons étudié une seconde modification post-traductionnelle de l'histone 3, à savoir la diméthylation sur la lysine 4. Bien que moins marqués que ceux obtenus pour H3K18ac, les résultats vont également dans le sens d'une diminution dans les cellules exposées

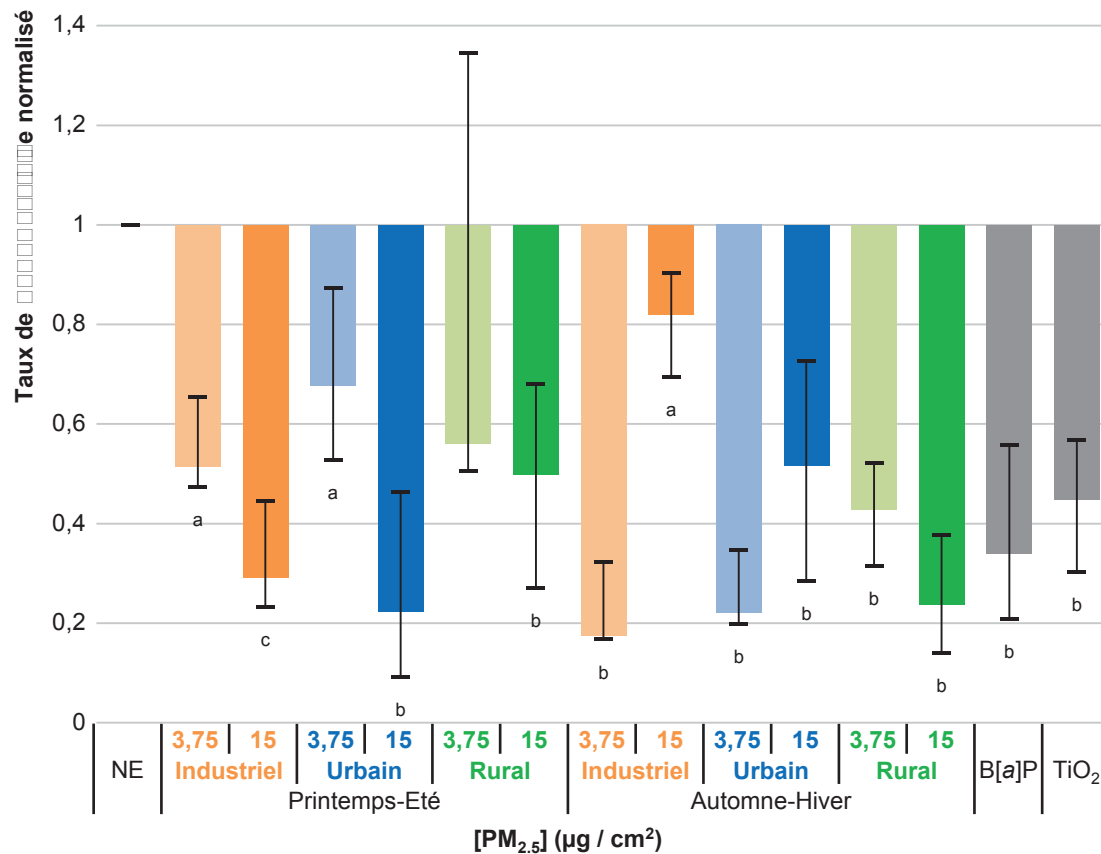


Figure III.22 : Taux d'acétylation de la lysine 18 de l'histone 3 (H3K18ac), rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), mesuré après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 a : P < 0,05 ; b : P < 0,01 ; c : P < 0,001

(Figure III.23). L'effet est significatif dans les cellules exposées aux conditions 2I2, 2U2 et 2R, conduisant respectivement à un taux de H3K4me2 correspondant à 51 %, 24 % et 12 % de celui observé dans les cellules non-exposées. Dans les autres conditions d'exposition, les variations indiquent également une tendance à la diminution du ratio H3K4me2 / H3 total. Les cellules exposées au B[a]P ou au TiO₂ présentent elles aussi des taux inférieurs de H3K4me2, équivalents à 28 % et 23 % de celui observé dans les cellules non-exposées ($p < 0,05$).

Nous avons comparé les effets dose, site et campagne dans la modification de cette marque épigénétique, sans pouvoir mettre en évidence de différences significatives entre les conditions d'exposition ($P > 0,1$, quelle que soit la comparaison). Cependant, il semble que les particules collectées au cours de la saison automne-hiver conduisent globalement à une réduction plus importante du taux de diméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (Tableau III.24).

Site	Réduction H3K4me2 : AH/PE	
	3,75 µg / cm ²	15 µg / cm ²
Industriel	4,97	0,82
Urbain	2,65	4,11
Rural	1,44	5,33

Tableau III.24 : Comparaisons intercampagnes de la réduction du taux de H3K4me2 en réponse aux PM_{2.5}.

7.3. Expression des miRNA

Afin de compléter le panel des mécanismes susceptibles d'être impliqués dans le potentiel cancérigène des PM_{2.5}, nous avons évalué la modulation de l'expression de trois miRNA par l'exposition aux PM_{2.5}.

Nous avons ainsi mesuré le niveau d'expression de miR-21, miR-26b et miR-27a dans les cellules BEAS-2B exposées pendant 72 h aux six prélèvements de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

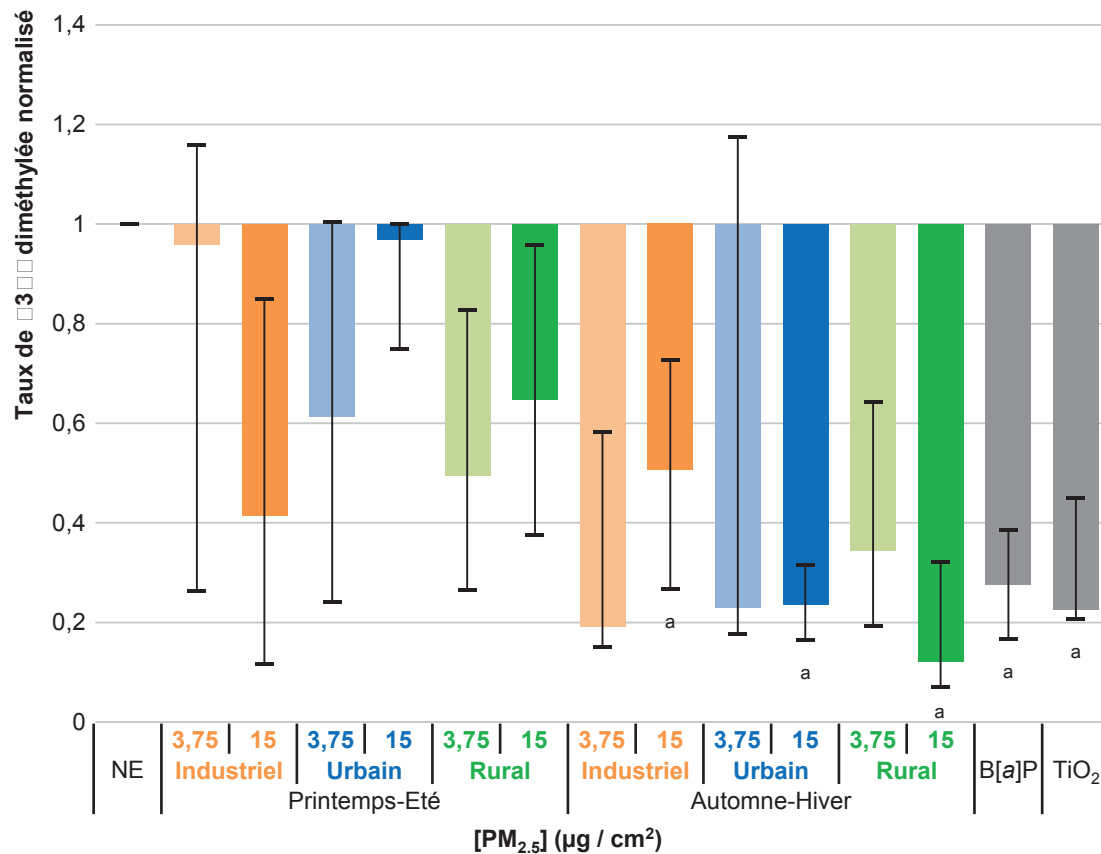


Figure III.23 : Taux de diméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me2), rapporté aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), mesuré après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 a : P < 0,05

7.3.1. miR-21

Nos résultats montrent que miR-21 a un niveau d'expression très reproductible dans les cellules non-exposées (Q1 = 0,98 ; Q3 = 1,04) (Figure III.24). Il est significativement induit dans les cellules exposées à tous les échantillons PM_{2.5} à la concentration la plus forte. Ainsi, les RQ observés à la concentration 15 µg / cm² sont compris entre 4,48 (1I2) et 1,38 (2R2) ($p < 0,01$ pour toutes les comparaisons). De même, l'expression de miR-21 est presque systématiquement induite à la concentration la plus faible, avec des valeurs de RQ significatives ($p < 0,05$), sauf pour l'échantillon 2I, et comprises entre 1,59 (1I1) et 2,17 (1R1). L'exposition des cellules au B[a]P, et dans une moindre mesure au TiO₂, conduit également à une surexpression de miR-21 (RQ = 1,43 et RQ = 1,21, respectivement ; $p < 0,05$).

Les variations observées suivent une relation-dose réponse significative pour tous les échantillons, hormis pour les particules 2R. Les rapports RQ₁₅ / RQ_{3,75} sont ainsi compris entre 1,50 (2U) et 2,81 (1I) ($p < 0,05$).

Nous avons ensuite comparé les effets des particules en fonction de leur site de prélèvement. Alors qu'il n'existe pas de différence significative entre les échantillons de la première campagne, les particules industrielles et urbaines collectées au cours de la saison automne-hiver induisent miR-21 de manière plus importante que les particules rurales lorsque la concentration est de 15 µg / cm² ($p < 0,05$).

Concernant les variations intercampagnes, les effets sont plus importants dans les cellules exposées aux PM_{2.5} collectées au cours de la saison printemps-été (Tableau III.25). Cette différence est significative pour les échantillons urbains et ruraux à la concentration la plus forte ($p < 0,05$).

miR-21	3,75 µg / cm ²		15 µg / cm ²	
	RQ _{PE} / RQ _{AH}	<i>p</i>	RQ _{PE} / RQ _{AH}	<i>p</i>
Industriel	1,23	ns	1,76	ns
Urbain	1,12	ns	1,89	a
Rural	1,28	ns	2,91	a

Tableau III.25 : Comparaisons intercampagnes du niveau d'expression de miR-21.
(Test *U* de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; a : $p < 0,05$)

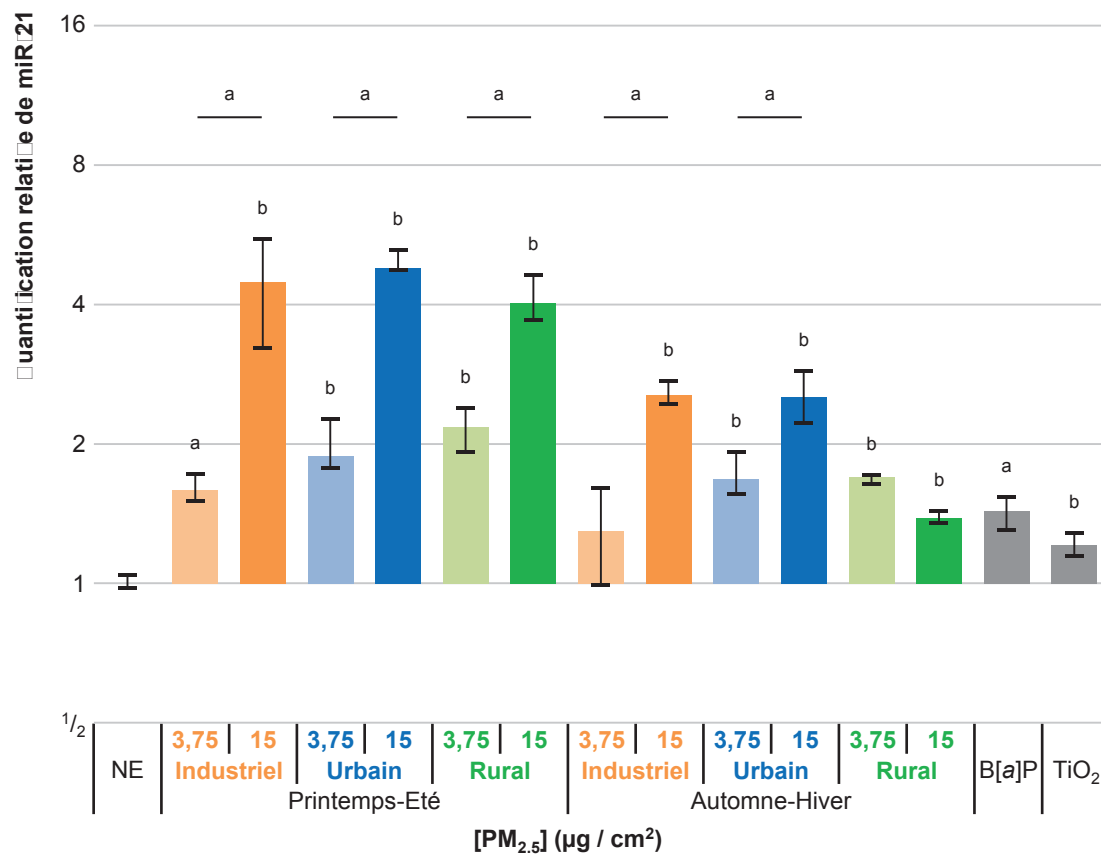


Figure III.2 : Quantification de miR-21, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

7.3.2. miR-26b

Nos observations mettent en évidence une inhibition de l'expression de miR-26b dans les cellules exposées aux échantillons de PM_{2.5} à la concentration la plus élevée (Figure III.25). En effet, les valeurs de RQ obtenues sont comprises entre 0,61 (1I2) et 0,39 (1U2), soit une diminution de l'expression de miR-26b allant de 1,64 à 2,56 fois dans les cellules exposées à 15 µg de PM_{2.5} / cm² ($p < 0,05$, sauf 2U2 $p < 0,1$). Cependant, il n'existe pas de variation à la concentration 3,75 µg / cm², hormis une tendance pour l'échantillon 1R (RQ = 0,61 ; $p < 0,1$). L'exposition des cellules au B[a]P ou au TiO₂ ne modifie pas l'expression de ce miRNA.

La diminution de l'expression de miR-26b suit une relation dose-réponse, parfois significative, avec des ratios RQ₁₅ / RQ_{3,75} compris entre 0,85 (1R) et 0,47 (1U) (Tableau III.26).

miR-26b	Printemps-Eté		Automne-Hiver	
	RQ ₁₅ / RQ _{3,75}	<i>p</i>	RQ ₁₅ / RQ _{3,75}	<i>p</i>
Industriel	0,56	a	0,56	a
Urbain	0,47	t	0,56	ns
Rural	0,85	ns	0,49	t

Tableau III.26 : Effet de la dose sur le niveau d'expression de miR-26b.
(Test *U* de Mann-Whitney ; ns : non-significatif ; t : tendance $p < 0,1$; a : $p < 0,05$)

Les comparaisons intersites et intercampagnes ont été réalisées, mais n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les échantillons de PM_{2.5}.

7.3.3. miR-27a

miR-27a présente, comme les miRNA précédents, un niveau d'expression stable dans les cellules non-exposées (Q1 = 0,90 ; Q3 = 1,03) (Figure III.26). Les variations observées sont de faible amplitude et vont dans le sens d'une diminution de l'expression de ce miRNA. Ainsi, le niveau d'expression de miR-27a est réduit dans les cellules exposées dans les conditions 1I2 (RQ = 0,65 ; $p < 0,05$), 1U1 (RQ = 0,71 ; $p < 0,05$), 1U2 (RQ = 0,68 ; $p < 0,05$) et 2U2 (RQ = 0,67 ; $p < 0,05$). Une tendance à la diminution est également observée pour la condition 2I2 (RQ = 0,73 ; $p < 0,1$). Contrairement à ce qui était observé pour miR-26b, l'exposition des cellules au B[a]P ou au TiO₂ conduit à une inhibition de miR-27a (RQ = 0,75 pour le B[a]P, $p < 0,05$; RQ = 0,82 pour le TiO₂, $p < 0,1$).

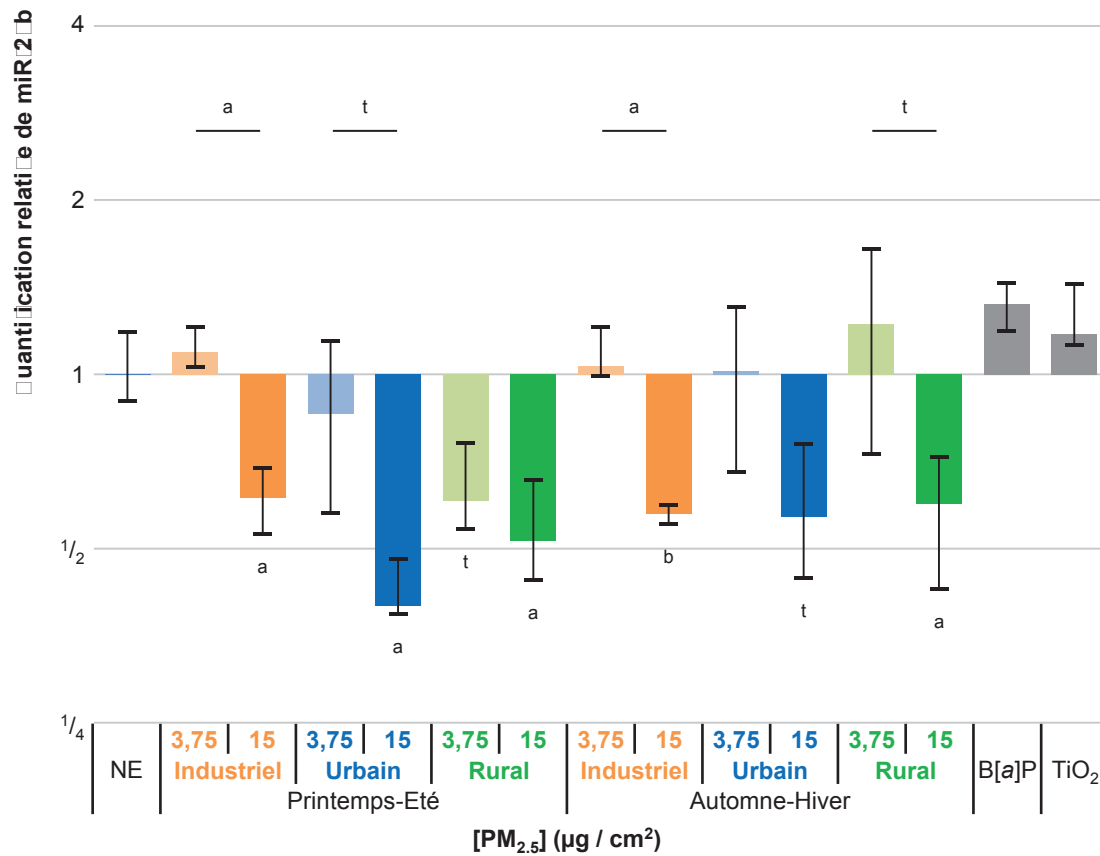


Figure III.25 : Quantification de miR-26b, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 t : tendance P < 0,1 ; a : P < 0,05 ; b : P < 0,01

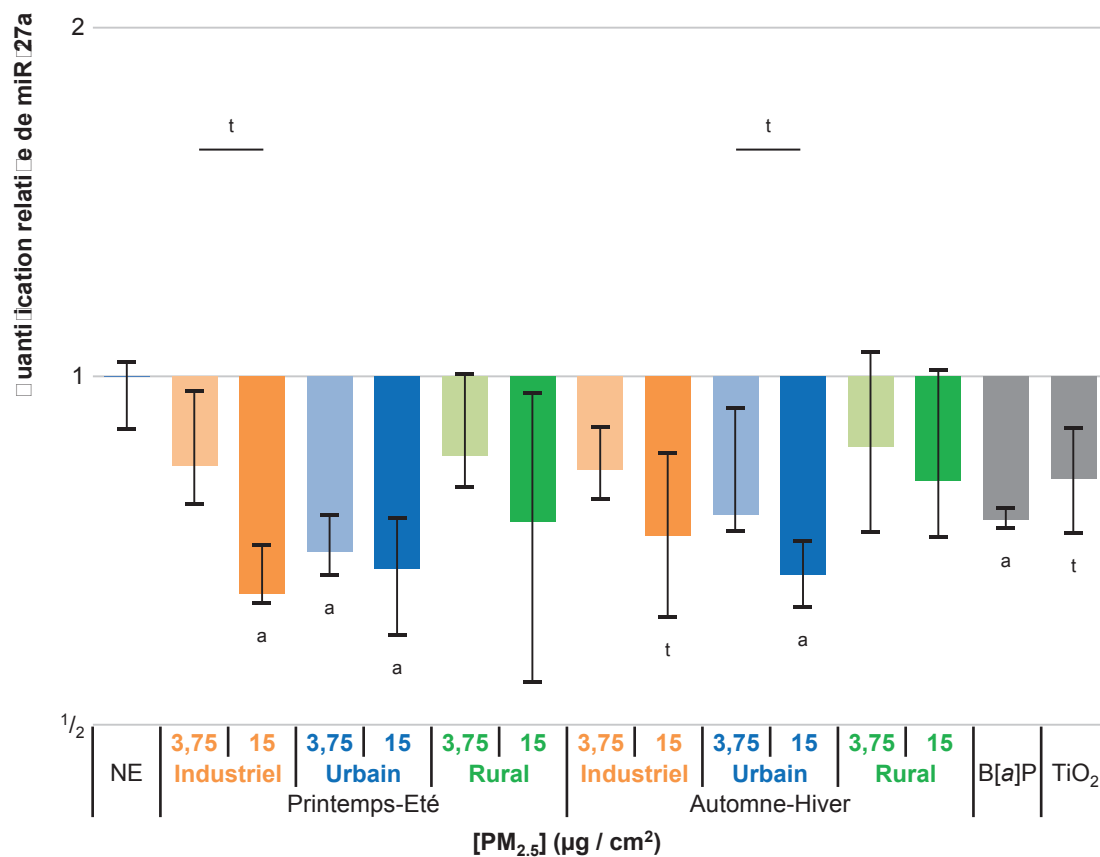


Figure III.2 : Quantification de miR-27a, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (NE), après exposition pendant 72 h aux échantillons de PM_{2.5} à une concentration de 3,75 ou 15 µg / cm².

Médiane [Q1;Q3], n = 4 ; Comparaison NE (= 1) et effet dose : tests U de Mann-Whitney
 t : tendance P < 0,1 ; a : P < 0,05

L'exposition des cellules aux échantillons de PM_{2.5} conduit vraisemblablement à une relation de type dose-réponse dans l'intensité des effets, même si leur faible amplitude ne permet pas d'obtenir des différences statistiquement significatives.

Enfin, les comparaisons intersites et intercampagnes que nous avons réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence de variations significatives entre les échantillons de PM_{2.5}.

7.4. Corrélation avec la composition des PM_{2.5}

Nous avons évalué les corrélations entre la composition chimique des échantillons de PM_{2.5} et leurs effets épigénétiques (Tableau III.27). Si l'on considère uniquement les résultats obtenus à la concentration 3,75, le niveau de méthylation de *P16^{INK4A}* est positivement corrélé à la teneur en métaux de transition ($\rho = 0,269$). La réduction du taux de diméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 semble quant à elle associée à la concentration en HAP ou à la B[a]P-CEC ($\rho = -0,280 / -0,289$). Le niveau d'expression de miR-21 est très fortement corrélé à la concentration en métaux ($\rho = 0,550 / 0,552$). A l'inverse l'expression de miR-26b et de miR-27a y sont négativement associées.

		Métaux Transition	Autres Métaux	HAP	B[a]P-CEC
<i>P16^{INK4A}</i>	3,75 µg / cm ²	0,2	0,135	0,130	-0,150
	15 µg / cm ²	-0,159	0,008	0,130	0,127
<i>MGMT</i>	3,75 µg / cm ²	0,041	0,007	0,176	0,054
	15 µg / cm ²	-0,056	0,241	-0,117	-0,167
Modifications histone 3	H3K18ac	-0,069	-0,077	-0,217	-0,184
	H3K4me2	-0,039	0,029	0,2	0,2
miRNA	miR-21	0,550	0,552	0,138	-0,120
	miR-26b	0,35	0,12	0,3	-0,218
	miR-27a	0,35	-0,263	-0,231	-0,076

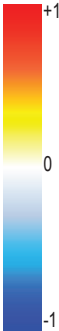


Tableau III.27 : Corrélations entre la composition des PM_{2.5} et les effets épigénétiques. les valeurs en gras indiquent des corrélations significatives (ρ de Spearman, $p < 0,05$)

7.5. Discussion

Les mécanismes épigénétiques font partie intégrant des anomalies moléculaires impliquées dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire (Adcock *et al.*, 2006; Herman, 2004; Schwartz *et al.*, 2007). 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 sept modifications épigénétiques sélectionnées pour (i) recouvrir les trois mécanismes épigénétiques décrits (méthylation de deux promoteurs, deux modifications post-traductionnelles d'histone et trois miRNA), (ii) leur implication décrite ou supposée dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire et (iii) leur éventuelle induction par certains composants des PM_{2.5} ou de mélanges similaires.

Nous avons ainsi commencé notre étude des mécanismes épigénétiques par une analyse du statut de méthylation des promoteurs de deux gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la cancérogenèse : *P16^{INK4A}* et *MGMT*.

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 cellules BEAS-2B aux PM_{2.5}, nous avons constaté une hyperméthylation de l'ADN associée à l'exposition à de faibles concentrations en PM_{2.5} riches en métaux. Ceci est cohérent avec de précédentes études ayant mis en évidence une hyperméthylation 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.*, 2011a). Cette hyperméthylation impliquerait une voie de signalisation déclenchée par les ROS (Govindarajan *et al.*, 2002; Soberanes *et al.*, 2012). Nous ne disposons cependant pas de point de comparaison pour expliquer l'effet inversement proportionnel à la dose de PM_{2.5} que nous avons observé.

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.*, 1999b; Liu *et al.*, 2008; Zochbauer-Muller *et al.*, 2001). Il n'existe que peu d'études concernant l'impact de polluants environnementaux sur la méthylation de *MGMT*, 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). Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans les cellules exposées aux PM_{2.5}, malgré une légère tendance dans les cellules exposées à l'échantillon le plus riche en métaux.

De manière générale, les rapports ADN_{méthylé} / ADN_{non-méthylé} pour ces deux gènes sont relativement variables, même dans les cellules non-exposées pour lesquelles l'intervalle inter-quartile s'étale sur 2,5 (*MGMT*) ou 3 cycles (*P16^{INK4A}*). Ceci pourrait expliquer l'absence de significativité des résultats obtenus, malgré des effets visuellement importants pour *P16^{INK4A}*. Cette variabilité pourrait éventuellement être due à l'adaptation du protocole

classique de PCR conventionnelle et quantification sur gel d'agarose en une méthode de qPCR, qui nécessitera donc des étapes supplémentaires de validation.

En conclusion, les données de cette première analyse suggèrent que certains échantillons de PM_{2.5} induisent, à la concentration la plus faible, une hyperméthylation de P16^{INK4A} qui pourrait conduire à une diminution de l'expression de ce gène, potentiellement impliquée dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

Ayant mis en évidence la capacité de certains échantillons à provoquer des modifications du profil de méthylation d'un gène suppresseur de tumeur, nous avons poursuivi notre étude par l'analyse de deux modifications post-traductionnelles de l'histone 3. Nous avons ainsi mesuré le taux d'acétylation de la lysine 18 et le taux de diméthylation de la lysine 4, deux modifications associées à un mauvais pronostic lorsqu'elles sont diminuées dans des tumeurs pulmonaires (Barlesi *et al.*, 2007; Seligson *et al.*, 2009). La diméthylation de H3K4 serait associée à une activation de la transcription (Wang *et al.*, 2008; Wiencke *et al.*, 2007), alors que la désacétylation de H3K18 semble associée au processus oncogénique (Ferrari *et al.*, 2008, 2012) et dépendante d'une histone désacétylase spécifique (Barber *et al.*, 2012).

Les deux marques épigénétiques étudiées se trouvent diminuées dans les cellules BEAS-2B exposées aux échantillons de PM_{2.5}. Cette observation peut sembler surprenante pour H3K4me2, car différentes études ont montré que cette modification post-traductionnelle était augmentée dans des cellules A549 exposées à l'arsénite (Zhou *et al.*, 2008), ainsi que dans les leucocytes périphériques de travailleurs en aciérie, avec une association positive aux concentrations en nickel, en fer et en arsenic (Cantone *et al.*, 2011). Cependant, nos observations suggèrent que les métaux contenus dans les PM_{2.5} n'influenceraient pas cette modification, qui serait plutôt associée aux concentrations en HAP, observation cohérente avec l'étude de Schnekenburger *et al.*, ayant mis en évidence une diminution de cette marque épigénétique après exposition de cellules murines au B[a]P (Schnekenburger *et al.*, 2007). Concernant l'hypoacétylation de H3K18, nous n'avons trouvé aucune étude portant sur les effets de contaminants environnementaux, en dehors d'un travail montrant que la concentration en arsenic dans l'eau est corrélée au taux de H3K18ac positivement chez les hommes et négativement chez les femmes (Chervona *et al.*, 2012). Nos résultats ne nous ont pas permis de détecter d'association avec une famille particulière de composés chimiques, contrairement à H3K4me2.

En résumé, l'étude de ces deux modifications post-traductionnelles de l'histone 3 montre que l'exposition de cellules aux PM_{2.5} conduit à un profil similaire à celui observé dans les tumeurs pulmonaires de mauvais pronostic. Néanmoins, il conviendrait d'étudier plus en détails les composés chimiques ainsi que les mécanismes impliqués, de même que le maintien dans le temps de ces modifications épigénétiques.

Afin de compléter le panel des mécanismes épigénétiques étudiés, nous avons évalué l'expression de trois miRNA dans les cellules exposées.

Le premier miRNA étudié est miR-21, impliqué dans la coordination de la réponse au stress oxydant induit par l' H_2O_2 dans différents types cellulaires (Cheng *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009). Il a également été montré que l'expression de miR-21 était significativement augmentée dans les tissus de NSCLC (Capodanno *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2011; Markou *et al.*, 2013; Solomides *et al.*, 2012), et qu'un niveau élevé de miR-21 était associé à un mauvais pronostic dans les cas de NSCLC (Wang *et al.*, 2013). Nous avons mis en évidence une surexpression de miR-21, après exposition à tous les échantillons de $PM_{2.5}$, fortement corrélée à la concentration en métaux. Ceci est en adéquation avec l'étude menée par Bollatti *et al.*, ayant mis en évidence que l'expression de miR-21 était augmentée après une exposition professionnelle à des particules riches en métaux ; cette étude a également montré que son niveau d'expression était positivement corrélé au taux de 8-OHdG, un adduit d'oxydation à l'ADN, soulignant le rôle joué par le stress oxydant dans sa surexpression (Bollatti *et al.*, 2010).

Nous avons ensuite étudié l'expression de miR-26b, connu pour inhiber la signalisation proapoptotique dans un environnement hypoxique (Kulshreshtha *et al.*, 2007) et intervenir dans la régulation du cycle cellulaire (Hou *et al.*, 2011b). Il a également été montré que l'expression de ce miRNA était diminuée dans certains types de tumeurs pulmonaires (Gao *et al.*, 2011; Solomides *et al.*, 2012). Nous avons mis en évidence une inhibition de ce miRNA dans les cellules exposées aux $PM_{2.5}$ à la concentration la plus forte. Cette inhibition semble être inversement proportionnelle à la quantité de métaux. Nous n'avons pas pu trouver de publication faisant référence à un effet des métaux sur l'expression de miR-26b, mais celui-ci a été décrit comme inhibé dans des cellules pulmonaires exposées aux radiations ionisantes (Arora *et al.*, 2011), à des extraits de fumée de cigarette (Izzotti *et al.*, 2009) ou à des particules diesel (Jardim *et al.*, 2009), observations cohérentes avec nos résultats.

Enfin, nous avons étudié l'expression de miR-27a, dont le rôle est encore sujet à controverses. En effet, il semblerait agir comme un oncogène dans des cellules épithéliales bronchiques (Wang *et al.*, 2011b), mais son inhibition augmente la prolifération cellulaire et la proportion de cellules indifférenciées *in vitro* (Miao *et al.*, 2013). Néanmoins, l'expression de miR-27a est significativement réduite dans le sérum des patients atteints de NSCLC (Heegaard *et al.*, 2012). Nos résultats montrent une faible inhibition de ce miRNA, inversement corrélée à la concentration en métaux. Nous n'avons pas trouvé de données quant aux substances chimiques susceptibles de modifier l'expression de ce miRNA. En revanche, il a été décrit comme inhibé dans des cellules épithéliales bronchiques humaines

exposées à des particules diesel, ce qui est cohérent avec nos observations (Jardim *et al.*, 2009).

Nous avons ainsi étudié l'expression de trois miRNA après exposition des cellules BEAS-2B aux échantillons de PM_{2.5}. L'analyse de la combinaison de ces 3 miRNA grâce au logiciel miRPath (Vlachos *et al.*, 2012) met en évidence une très forte probabilité que les trois miRNA soient impliqués dans les voies de signalisation associées au cancer ($p < 10^{-9}$) et que deux d'entre eux (miR-21 et miR-26b) le soient dans les SCLC ($p < 10^{-11}$) et les NSCLC ($p < 0,002$). De plus, bien que le lien entre la composition des PM_{2.5} et l'inhibition de miR-26b et miR-27a reste à approfondir, il semble que les métaux contenus dans les PM_{2.5} soient responsables de la surexpression de miR-21, probablement en lien avec un stress oxydant.

Même si les conséquences de ces altérations épigénétiques seront à vérifier dans les cellules exposées aux PM_{2.5} (expression protéique de P16, spécificité de l'hypoacétylation de H3K18, expression des cibles de miRNA), nous avons mis en évidence la capacité des échantillons de PM_{2.5} à modifier les trois types de mécanismes épigénétiques. Nos résultats permettent également de suggérer des liens entre certaines modifications épigénétiques et des familles de composés chimiques particulières. Enfin, nos observations soulignent la nécessité d'évaluer la toxicité épigénétique des PM_{2.5}, car les modifications qu'elles sont susceptibles d'induire pourraient avoir des conséquences importantes sur l'initiation d'un processus tumoral au niveau pulmonaire.

DISCUSSION GENERALE

La pollution atmosphérique est la 13^{ème} cause de décès au niveau mondial et représente donc un problème de santé publique majeur (Ezzati *et al.*, 2002). Parmi les polluants présents dans l'atmosphère, les particules se distinguent par leur hétérogénéité tant au niveau de leurs caractéristiques physiques que chimiques, compliquant de fait l'étude de leurs mécanismes d'action toxique. Ainsi, alors que plusieurs études épidémiologiques suggèrent un lien entre une exposition chronique à la pollution atmosphérique particulaire et les cancers broncho-pulmonaires (Carey *et al.*, 2013; Katanoda *et al.*, 2011), les mécanismes impliqués dans cette éventuelle cancérogénicité restent à éclaircir. De plus, ces études ne prennent pas en compte les caractéristiques intrinsèques des particules autres que leur classe granulométrique. Or, il apparaît évident d'après les nombreuses études *in vitro* et *in vivo* publiées, que toutes les particules n'ont pas la même toxicité et que la dose seule ne peut suffire à expliquer les effets délétères qu'elles engendrent. Ainsi, la question de l'influence de la composition des particules sur leurs effets toxiques reste un autre point à approfondir.

Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif d'étudier *in vitro* la capacité de six échantillons réels de particules fines (PM_{2.5}) à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancerogenèse sur la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et d'associer les effets observés à la composition chimique des PM_{2.5}. Les échantillons de particules ont été prélevés au cours de deux saisons (printemps-été 2008 et automne-hiver 2008-2009) et sous trois influences distinctes : industrielle, urbaine et rurale, avant d'être soumis à une caractérisation physico-chimique approfondie. La sélection des particules faite par l'utilisation d'impacteurs en cascade similaires permet d'obtenir des échantillons de distribution granulométrique similaire (plus de 79 % de PM_{2.5}). De plus, les surfaces spécifiques mesurées pour les six échantillons de PM_{2.5} sont du même ordre de grandeur (comprises entre 2,8 et 6,2 m² / g). Ainsi, les différences de réponse observées d'un échantillon de PM_{2.5} à l'autre au cours de notre étude sont vraisemblablement dues à des compositions chimiques différentes, comme l'ont déjà suggéré plusieurs études (Perrone *et al.*, 2010, 2013; Plummer *et al.*, 2012).

Notre travail a débuté par une étude de la fraction biologique des PM_{2.5}, qui a révélé la présence de différentes espèces bactériennes et fongiques viables, particulièrement importante dans l'échantillon d'origine rurale collecté au cours de la saison printemps-été. Cette fraction biologique serait susceptible d'accroître les effets toxiques des PM_{2.5} dans le cadre d'une exposition réelle, en initiant par exemple une réponse inflammatoire (Lugade *et al.*, 2011; Pfeifer *et al.*, 2013).

Nous avons ensuite étudié la mutagénicité des échantillons de PM_{2.5} par test d'Ames sur trois souches de sensibilité variable, avec ou sans activation métabolique. Cette étude a mis

en évidence le fort potentiel mutagène des PM_{2.5} malgré l'absence d'extraction préalable des composés organiques. Nos résultats ont montré une mutagénicité plus importante des échantillons collectés au cours de la saison automne-hiver, en particulier pour l'échantillon d'origine rurale (Tableau III.28). La mutagénicité des PM_{2.5} est vraisemblablement liée à la présence de composés nitro-aromatiques (Traversi *et al.*, 2009, 2011), alors que le corps de la particule ne semble pas avoir d'influence majeure sur la mutagénicité dans le modèle que nous avons utilisé.

Après avoir étudié ces différentes caractéristiques intrinsèques, nous nous sommes attachés à étudier l'impact des échantillons de PM_{2.5} sur les cellules BEAS-2B, en orientant notre étude vers (i) l'activation des systèmes de métabolisation des composés organiques en réponse aux PM_{2.5}, (ii) les effets génotoxiques directs et indirects des particules sur les cellules exposées et (iii) la modulation de différents mécanismes épigénétiques suite à l'exposition des cellules aux PM_{2.5}.

Pour ce faire, nous avons utilisé des concentrations surfaciques identiques quel que soit l'échantillon, fixées à 3,75 et 15 µg / cm². Ces concentrations, bien que nettement supérieures à celles auxquelles serait confronté un individu dans le cadre d'une exposition réelle, ont été déterminées sur la base de tests de cytotoxicité préalables afin d'encadrer la concentration inhibitrice à 10 %. Alors que l'activation du métabolisme des composés organiques a été mesurée selon une cinétique 24 h / 48 h / 72 h, l'ensemble des tests de génotoxicité et épigénétiques a été conduit sur le temps d'exposition le plus long (72 h) afin de détecter préférentiellement les lésions les plus stables.

Nous avons réalisé cette étude sur la lignée cellulaire BEAS-2B, ayant pour origine un épithélium bronchique humain normal et immortalisée par l'antigène T du virus SV40. Ce choix présente un triple avantage, lié (i) à l'utilisation d'un modèle *in vitro*, (ii) au type de cellules sélectionné et (iii) 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. A cet effet, toutes les cellules utilisées ont été amplifiées à partir d'une même ampoule initiale. De plus, les différentes études ont été réalisées sur des cellules d'origine normale entre le 5^{ème} et le 7^{ème} passage, stade auquel seuls quelques changements caryotypiques mineurs, n'étant pas associés à un potentiel tumorigène chez la souris, ont été observés (Ohnuki *et al.*, 1996). Cette lignée est ainsi plus proche des mêmes cellules dans des conditions physiologiques, en comparaison avec une lignée tumorale telle que les cellules A549. Enfin, les capacités métaboliques des cellules BEAS-2B ont été démontrées, notamment concernant l'activation métabolique des HAP et des COV (Sheets *et al.*, 2004; Uppstad *et al.*, 2010).

	Printemps-Été			Automne-Hiver			Effet sur CBP ?	Décrit pour PM _{2,5} <i>in vitro</i> ?
	Industriel	Urbain	Rural	Industriel	Urbain	Rural		
TA102	pas d'effet						↑	N
TA98	min			min			↑	O
YG1041	min		min	min		max	↑	O
<i>CYP1A1</i> mRNA	min			max			↑	O
<i>CYP1B1</i> mRNA	min		min	min		max	↑	O
<i>CYP2S1</i> mRNA	min		min	min		min	?	N
<i>NQO1</i> mRNA	min		min	min		min	↓	O
Activité CYP1A1 et 1B1	min		min	max		min	↑	O
Adduits encombrants	min		min	max		min	↑	O
Fragmentation ADN	min		min	min		min	↑	O
Cassures double-brin	min		min	min		max	↑	O
Micronoyaux	min			min		min	↑	O
Téломérases	min		min	min		max	?	N
Méthylation <i>P16^{INK4A}</i>	min		min	min		min	↑	O
Méthylation <i>MGMT</i>	min		min	min		min	↑	N
H3K18ac	min		min	min		min	↑	N
H3K4me2	min		min	min		min	↑	N
miR-21	max			min		min	↑	O
miR-26b	min		min	min		min	↑	N
miR-27a	min		min	min		min	?	N

Tableau III.2 □ : Intensité des effets obtenus selon l'origine des échantillons de PM_{2,5}.

□ pas d'effet
 min (tendance)
 ↓ (p<0,05 pour 3,75 ou 15 µg / cm²)
 ↓ (p<0,05 3,75 et 15 µg / cm²)
 ↓ max (p<0,05 et effet supérieur)

L'évaluation de l'activité métabolique des cellules exposées a mis en évidence une très forte induction génique du *CYP1A1* et, dans une moindre mesure, du *CYP1B1*. Cette induction semble liée à la composition en HAP des particules, conduisant à des effets plus importants pour les PM_{2.5} collectées en saison automne-hiver, en particulier pour l'échantillon rural (Gualtieri *et al.*, 2012). Il apparaît néanmoins que leur activité est également influencée par la concentration en métaux, donnant lieu, pour une saison de prélèvement donnée, à une activité supérieure dans les cellules exposées aux particules industrielles et suggérant ainsi un effet synergique entre les HAP et les métaux (Garçon *et al.*, 2004).

Nous avons ensuite étudié la génotoxicité des PM_{2.5}, en commençant par la quantification d'un premier type de lésion primaire qu'est la formation d'adduits encombrants à l'ADN. Nous avons mis en évidence l'apparition d'adduits similaires à ceux observés après exposition aux HAP, en particulier dans les cellules exposées aux PM_{2.5} d'origine industrielle. Ceci serait lié à l'augmentation de l'activité des *CYP1A1* et *CYP1B1* décrite précédemment, qui favoriserait la production d'intermédiaires réactifs tels que le BPDE (Castell *et al.*, 2005; Nebert and Dalton, 2006; Shimada, 2006). Un autre type d'adduit a également été mis en évidence dans certaines conditions, dont la localisation suggère l'implication de composés nitro-aromatiques (Ovrevik *et al.*, 2010) et dont le nombre est plus important après exposition aux PM_{2.5} collectées au cours de la saison automne-hiver. Nous avons poursuivi l'étude des lésions primaires de l'ADN induites par les PM_{2.5} par l'étude de la fragmentation globale de l'ADN, ainsi que l'analyse spécifique des cassures double-brin. Leur apparition en phases S et G₂/M laisse supposer qu'elles auraient pour origine des lésions simple-brin non-réparées avant la réplication et probablement provoquées par les composés organiques, majoritaires en saison hivernale (Longhin *et al.*, 2013). Les profils obtenus en test des comètes et par la mesure de γ -H2AX n'étant pas superposables, il semble que des cassures simple-brins et des sites abasiques soient induits puis réparés avant la phase S, essentiellement après exposition aux échantillons industriels. Ces dommages seraient dus à la fraction inorganique des PM_{2.5} (Karlsson *et al.*, 2004), via la production de ROS comme l'ont suggéré différentes études *in vitro* (Deng *et al.*, 2013; Dergham *et al.*, 2012) et *in vivo* (Lemos *et al.*, 2011).

Ces lésions primaires de l'ADN, si elles ne sont pas réparées, de même que des mécanismes de génotoxicité indirecte altérant par exemple les systèmes de réparation de l'ADN ou le fuseau mitotique, peuvent avoir des conséquences sur l'intégrité des gènes, des chromosomes, ou du génome (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Des mutations, la perte de fragments de chromosomes, ou encore une aneuploïdie peuvent ainsi apparaître en conséquence de l'exposition à des agents génotoxiques. Nous avons ainsi recherché la présence de micronoyaux, susceptibles d'être induits de manière directe en conséquence de cassures double-brin ou indirecte via des altérations du fuseau mitotique (Kirsch-Volders *et al.*, 2011). L'exposition des cellules BEAS-2B aux PM_{2.5} induit la formation de micronoyaux

(Poma *et al.*, 2006; Roubicek *et al.*, 2007), mais nous n'avons pas détecté de différences entre les sites et saisons de prélèvement. Etant donné l'absence de corrélation avec le seul nombre de cassures double-brin, il est très probable que des mécanismes de génotoxicité indirecte interviennent également dans la formation de micronoyaux, bien que la méthode employée ne nous permette pas de l'affirmer avec certitude (Mateuca *et al.*, 2006). D'autres mécanismes indirects peuvent être impliqués dans l'apparition de dommages à l'ADN, tels que des perturbations de l'activité télomérase. En effet, une inactivation des télomérases peut conduire à une instabilité génétique (Frias *et al.*, 2012), alors que leur activation est associée à une perte de la sénescence répllicative, phénomène impliqué dans la promotion tumorale (Olaussen *et al.*, 2006). Selon la concentration en PM_{2.5} et l'échantillon, nous avons mis en évidence une perte d'activité télomérase qui semble induite par la fraction inorganique, agissant via la genèse d'un stress oxydant (Grahame and Schlesinger, 2012), ou une réactivation voire une hyperactivation des télomérases à forte dose, dans les échantillons riches en HAP de la saison automne-hiver.

L'étude de la génotoxicité des PM_{2.5} met ainsi en évidence l'induction de mécanismes directs et indirects de toxicité, susceptibles de conduire à des altérations décrites dans les étapes d'initiation et éventuellement de promotion de la cancérogenèse. Les composés organiques contenus dans les PM_{2.5} semblent majoritairement responsables des lésions génotoxiques les plus importantes (Bonetta *et al.*, 2009; Gualtieri *et al.*, 2012; Longhin *et al.*, 2013). Néanmoins, la fraction inorganique, à travers les métaux, a parfois des effets additifs voire synergiques avec les composés organiques dans l'induction d'effet génotoxiques, en provoquant par exemple des cassures supplémentaires de l'ADN ou en favorisant l'apparition d'adduits encombrants de HAP via l'activation des CYP. Dans le cadre d'une exposition humaine, cette fraction inorganique joue également le rôle de vecteur physique des composés organiques adsorbés, permettant leur pénétration puis leur rétention au niveau pulmonaire, augmentant ainsi le temps d'exposition des cellules aux substances toxiques (Churg *et al.*, 2003).

Nous avons enfin analysé différentes modifications épigénétiques en réponse aux PM_{2.5}, sélectionnées pour leur implication potentielle dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire. L'étude de la méthylation de l'ADN des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT*, a mis en évidence une hyperméthylation de *P16^{INK4A}* associée à l'exposition à de faibles concentrations en PM_{2.5} industrielles riches en métaux, vraisemblablement liée à la présence de ROS (Soberanes *et al.*, 2012). Cette hyperméthylation est susceptible d'induire une diminution de l'expression de ce gène suppresseur de tumeur et donc d'entraîner des dérégulations du cycle cellulaire (Baldi *et al.*, 2011). Les niveaux de diméthylation (K4) et d'acétylation (K18) de l'histone 3 ont été réduits après exposition aux PM_{2.5}. Dans le cas de H3K4me2, l'effet est

particulièrement marqué après exposition aux échantillons de la saison automne-hiver, riches en HAP. Cette étude a été réalisée de manière globale sur le génome et ne permet donc pas de déduire quels seraient les gènes impactés. Néanmoins, de telles modifications ont été décrites dans les cancers broncho-pulmonaires (Seligson *et al.*, 2009), bien que nous ne sachions pas si elles sont la cause ou la conséquence d'anomalies cellulaires. Enfin, les niveaux d'expression des miRNA étudiés ont été modifiés dans les cellules exposées aux PM_{2.5}, sans lien net avec la composition des PM_{2.5} pour miR-26b et miR-27a, mais avec une induction de miR-21 corrélée aux concentrations en métaux et donc particulièrement importante dans les cellules exposées aux particules de la saison printemps-été. Cette surexpression de miR-21 serait susceptible de promouvoir la cancérogenèse broncho-pulmonaire en inhibant l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Liu *et al.*, 2013).

Nous avons ainsi mis en évidence la capacité des PM_{2.5} à induire des altérations épigénétiques dans les cellules exposées, en touchant parfois simultanément les trois types de mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications d'histones et miRNA). Certaines des altérations identifiées inhibent l'expression de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, et seraient donc susceptibles de favoriser la promotion tumorale. Hormis les modifications d'histones analysées, en partie associées aux HAP mais dont nous ignorons les cibles exactes, les altérations épigénétiques étudiées semblent dépendre essentiellement des concentrations en métaux.

Il est important d'apporter quelques précisions concernant l'influence du site de prélèvement sur la toxicité des PM_{2.5}. En effet, nous avons parfois mis en évidence dans les chapitres précédents une toxicité supérieure des échantillons d'origine rurale collectés au cours de la saison automne-hiver. Ce résultat pourrait sembler surprenant de prime abord, mais s'explique par les concentrations très importantes en HAP retrouvées dans cet échantillon, vraisemblablement dues au brûlage de débris végétaux (tailles de haies, etc.) à la fin de l'automne, fréquent et toléré dans la région, à faible distance de notre lieu de collecte. De plus, il est important de souligner que nous avons exposé les cellules BEAS-2B à des concentrations surfaciques équivalentes pour les six échantillons de PM_{2.5}. Cette homogénéité ne prend donc pas en compte les concentrations atmosphériques en particules effectives au niveau des différentes localisations. Ainsi, les particules prélevées sous influence rurale ont une concentration atmosphérique nettement inférieure à celle observés pour les échantillons urbains et industriels (3,5 à 4,2 fois inférieure en saison estivale ; 6,8 à 8,1 en saison hivernale), diminuant d'autant l'exposition humaine et le risque représenté par les PM_{2.5} sur ces différents sites.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude avait pour objectif d'évaluer *in vitro* la capacité de six échantillons réels de particules fines (PM_{2.5}), collectés sous influence industrielle, urbaine ou rurale au cours des saisons printemps-été 2008 ou automne-hiver 2008-2009, à induire des altérations potentiellement impliquées dans le processus de cancerogenèse. Pour ce faire, nous avons étudié leur potentiel mutagène par test d'Ames, ainsi que les systèmes de biotransformation des composés organiques, leur génotoxicité directe et indirecte et leur capacité à induire des altérations épigénétiques, dans le modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B.

A l'issue de ce travail, la première constatation est que chacun des six échantillons de PM_{2.5} induit un grand nombre d'atteintes génotoxiques et épigénétiques. Bien que des résultats positifs en réponse aux PM_{2.5} natives aient déjà été obtenus pour différentes analyses intégrées aux 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; Dieme *et al.*, 2012; Val *et al.*, 2013) et de la génotoxicité (Abbas *et al.*, 2013; Gualtieri *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2004; Perrone *et al.*, 2010; Poma *et al.*, 2006), notre étude est, à notre connaissance, la première à mettre en évidence une modulation de l'expression du *CYP2S1*, de l'activité télomérase et des différents marqueurs épigénétiques étudiés, autres que la méthylation de *P16^{INK4A}*, en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

Il apparaît également que les particules collectées au cours de la saison automne-hiver, plus riches en HAP, sont celles qui ont les effets les plus importants en termes de mutagénicité sur les souches étudiées, d'expression et d'activité des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, ainsi que de lésions génotoxiques directes et de modifications post-traductionnelles de l'histone 3. A l'inverse, les particules collectées au cours de la saison printemps-été, plus riches en métaux, semblent avoir un effet supérieur sur la méthylation des promoteurs de *P16^{INK4A}* et *MGMT*, ainsi que sur l'expression des miRNA ciblés dans notre étude.

Nos résultats suggèrent également, en plus des effets propres à chaque fraction, l'existence de phénomènes d'additivité et parfois de synergie entre les différents composants des PM_{2.5}. En effet, la fragmentation de l'ADN détectée en test des comètes résulterait de l'effet des fractions organique et inorganique, même si les composés organiques semblent avoir un effet prédominant sur l'apparition de cassures double-brin. De plus, l'association au sein des particules industrielles de métaux et de HAP semble favoriser l'activité des enzymes impliquées dans l'activation métabolique de ces derniers, conduisant à la production accrue d'adduits encombrants à l'ADN. A noter également que la fraction inorganique particulière peut constituer un vecteur physique des composés organiques dans

le cadre d'une exposition humaine, favorisant et prolongeant ainsi la toxicité des PM_{2.5}. Nos résultats illustrent donc la complexité de « l'effet cocktail » associé à l'exposition à des mélanges de polluants, notamment à faibles doses.

A l'issue de ce travail, il apparaît donc que les échantillons de PM_{2.5} étudiés, de par l'action conjointe de leur fraction organique et inorganique, sont susceptibles d'induire *in vitro* de multiples lésions du patrimoine génétique et de son environnement, modifications décrites dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse broncho-pulmonaire (Figure III.27). Les composés organiques, issus des processus de combustion, semblent être responsables des effets génotoxiques les plus importants, alors que les métaux, émis en grande quantité par certains types d'industries, paraissent avoir des effets épigénétiques supérieurs. De plus, l'association de ces deux fractions constituerait un facteur favorisant certaines lésions.

Certaines précautions doivent être prises avant d'envisager une perspective plus large d'évaluation du risque pour la santé humaine. Il convient tout d'abord de rappeler que l'appareil respiratoire humain est un système complexe. Les effets toxiques des PM_{2.5} décrits dans notre étude ne seraient donc pas nécessairement générés, du fait par exemple de la présence de macrophages alvéolaires susceptibles de phagocyter les PM_{2.5}. De plus, nous n'avons pas d'information quant au devenir des lésions éventuellement induites ni des cellules impactées. 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. Sous réserve donc des conditions précitées, les zones présentant d'importantes concentrations atmosphériques en PM_{2.5} contenant de fortes quantités de composés organiques associées à la présence de métaux représenteraient un risque plus important pour la santé humaine.

Ce travail devrait être poursuivi selon trois axes visant à : (i) améliorer la représentativité de notre modèle, (ii) consolider les résultats obtenus et (iii) explorer plus en détails certains mécanismes d'action des PM_{2.5}.

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

Ainsi, une première perspective à ce travail serait d'améliorer notre modèle d'étude par l'utilisation de systèmes plus élaborés tels que des cultures en trois dimensions ou des co-cultures. Une étude financée par l'Institut National du Cancer est actuellement en cours

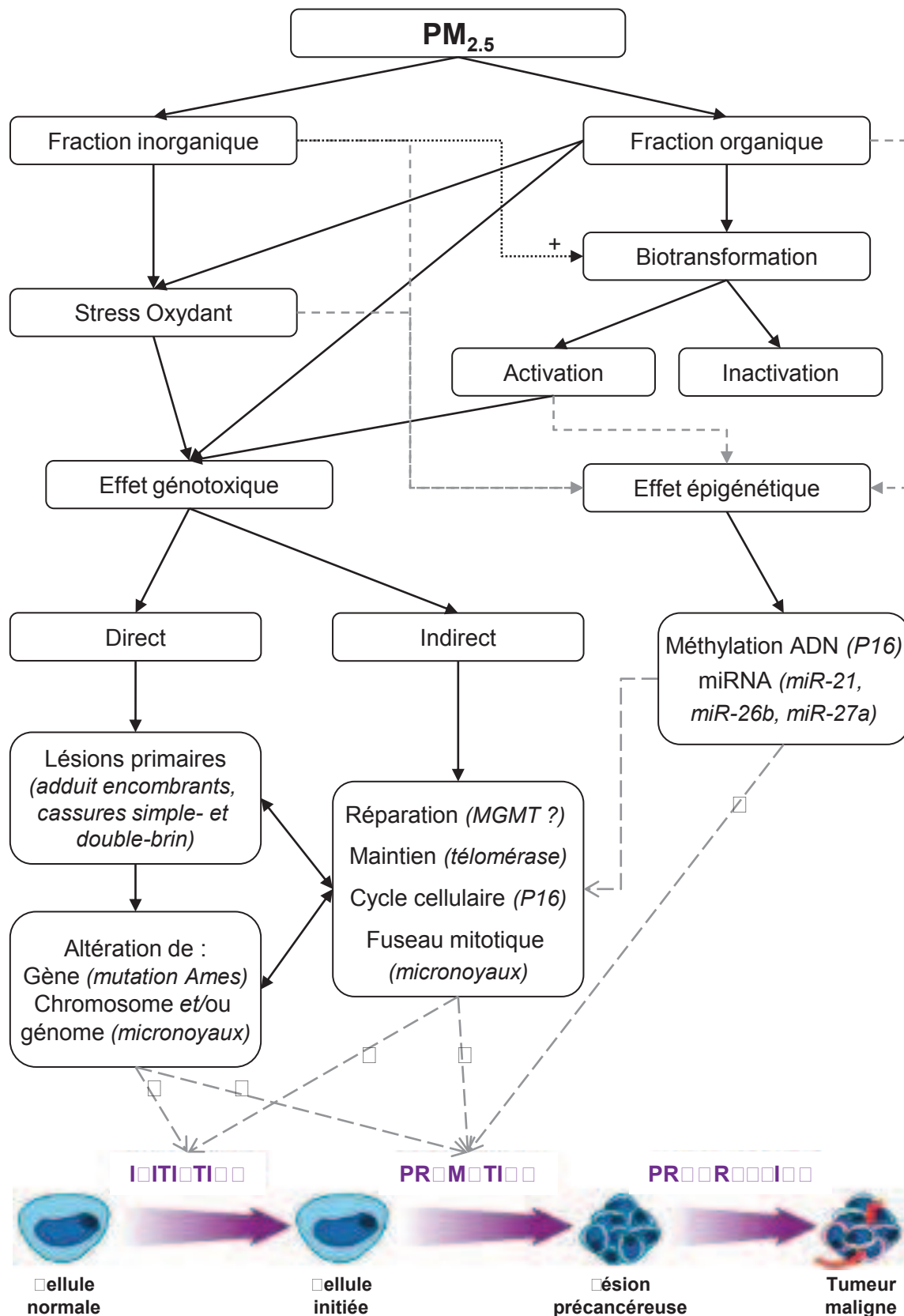


Figure III.27 : Représentation schématique du mode d'action et de l'implication potentiels des PM_{2.5} dans la cancérogénèse broncho-pulmonaire (en partie adapté de Kirsch-Volders *et al.*, 2003 ; image STE, 2013).

- effet démontré
- > effet supposé
-> effet favorisant

au laboratoire, visant à valider certains effets génotoxiques et épigénétiques d'un échantillon de PM_{2.5} dans un modèle de co-culture de macrophages alvéolaires humains isolés à partir de lavages broncho-alvéolaires et de cellules BEAS-2B.

Il pourrait également être intéressant d'évaluer certains des marqueurs présentés dans ce travail au cours d'une étude *in vivo*. Etant donné l'impossibilité de collecter une quantité importante de particules atmosphériques en un temps raisonnable, il conviendrait de s'orienter vers l'étude de particules plus facilement accessibles. Dans cette perspective, une étude sera réalisée courant 2014 sur des groupes de rats exposés de manière prolongée à des émissions d'échappement diesel filtrées ou non, dans le cadre d'un projet collaboratif financé par l'Inserm dans le contexte du Plan Cancer 2009-2013.

Il conviendra également d'étayer certains des résultats que nous avons obtenus. Cette consolidation passe par l'optimisation de certaines méthodes ainsi que par la démonstration d'un effet consécutif aux modifications observées.

D'un point de vue technique, il nous faudra améliorer la méthode de PCR méthylation-spécifique afin de réduire la variabilité de nos résultats et de pouvoir trancher sur un effet des PM_{2.5} sur la méthylation du promoteur de *MGMT*. Il pourrait également être intéressant de combiner notre protocole de recherche des micronoyaux à un marquage des centromères et des télomères, afin de déterminer s'ils sont provoqués par des agents clastogènes ou aneugènes.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence des modifications susceptibles d'être à l'origine d'effets que nous n'avons pas, faute de temps et de matériel, pu quantifier. Ainsi, la détermination de l'activité télomérase aurait pu être associée à une mesure de la longueur des télomères dans les cellules exposées. De même, il conviendra de quantifier l'expression de la protéine P16 dans des cellules exposées aux PM_{2.5}, afin de déterminer l'incidence de l'hyperméthylation de promoteur que nous avons observée. Il serait également pertinent de mesurer l'expression protéique des cibles des miRNA étudiés et en particulier de la protéine PTEN dont l'ARNm est régulé par miR-21. Enfin, nous envisageons de rechercher prochainement d'éventuelles altérations du cycle cellulaire induites par les PM_{2.5}.

A plus long terme, nous souhaiterions explorer deux nouvelles pistes de recherche concernant l'effet des PM_{2.5} sur les systèmes de réparation de l'ADN, ainsi que les mécanismes impliqués dans les effets épigénétiques observés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., and Garçon, G. (2009). Air pollution particulate matter (PM2.5)-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 (PM2.5) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J. Appl. Toxicol.* 33, 109–119.
- Abbey, D.E., Nishino, N., McDonnell, W.F., Burchette, R.J., Knutsen, S.F., Lawrence Beeson, W., and Yang, J.X. (1999). Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 373–382.
- Adamo, P., Giordano, S., Naimo, D., and Bargagli, R. (2008). Geochemical properties of airborne particulate matter (PM10) collected by automatic device and biomonitors in a Mediterranean urban environment. *Atmos. Environ.* 42, 346–357.
- Adcock, I.M., Ford, P., Ito, K., and Barnes, P.J. (2006). Epigenetics and airways disease. *Respir Res* 7, 21.
- Adedokun, J.A., Emofurieta, W.O., and Adedeji, O.A. (1989). Physical, mineralogical and chemical properties of harmattan dust at Ile-Ife, Nigeria. *Theor. Appl. Clim.* 40, 161–169.
- Adimoolam, S., and Ford, J.M. (2003). p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair* 2, 947–954.
- 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.
- Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi, A.M., Burow, M.E., and Tou, J. (2000). Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 275, 27694–27702.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allen, J.O., Dookeran, N.M., Taghizadeh, K., Lafleur, A.L., Smith, K.A., and Sarofim, A.F. (1996). Measurement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Size-segregated Atmospheric Aerosols in Massachusetts. *Env. Sci Technol* 30, 1023–1031.
- Alves, C., Vicente, A., Nunes, T., Gonçalves, C., Fernandes, A.P., Mirante, F., Tarelho, L., Campa, A.M.S. de la, Querol, X., Caseiro, A., *et al.* (2011). Summer 2009 wildfires in Portugal: Emission of trace gases and aerosol composition. *Atmos. Environ.* 45, 641–649.
- Alves, C.A., Gonçalves, C., Pio, C.A., Mirante, F., Caseiro, A., Tarelho, L., Freitas, M.C., and Viegas, D.X. (2010). Smoke emissions from biomass burning in a Mediterranean shrubland. *Atmos. Environ.* 44, 3024–3033.
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Goff, J.L., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., and Sichel, F. (2011). Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J Appl Toxicol* 31, 131–138.
- Andreae, M.O., and Merlet, P. (2001). Emission of trace gases and aerosols from biomass burning. *Glob. Biogeochem. Cycles* 15, 955–966.
- Andres, R.J., and Kasgnoc, A.D. (1998). A time-average inventory of subaerial volcanic sulfur emissions. *J. Geophys. Res.* 103, 251–261.
- Andryšák, Z., Vondráček, J., Marvanová, S., Cigánek, M., Neča, J., Pěňčíková, K., Mahadevan, B., Topinka, J., Baird, W.M., Kozubík, A., *et al.* (2011). Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 714, 53–62.
- Anisowicz, A., Huang, H., Braunschweiger, K.I., Liu, Z., Giese, H., Wang, H., Mamaev, S., Olejnik, J., Massion, P.P., and Del Mastro, R.G. (2008). A high-throughput and sensitive method to measure global DNA methylation: application in lung cancer. *BMC Cancer* 8, 222.
- Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* 13, 693–704.
- Arora, H., Qureshi, R., Park, A.-K., and Park, W.-Y. (2011). Coordinated Regulation of ATF2 by miR-26b in Irradiated Lung Cancer Cells. *PLoS One* 6.
- ATMO-EMD (2006). *Cadastre des émissions atmosphériques 2006 (ATMO Nord - Pas de Calais)*.
- Baccarelli, A., and Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 21, 243–251.
- Baccarelli, A., Wright, R.O., Bollati, V., Tarantini, L., Litonjua, A.A., Suh, H.H., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., and Schwartz, J. (2009). Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 572–578.
- 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.

Balmain, A., Gray, J., and Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.* 33, 238–244.

Balu, N., Padgett, W.T., Lambert, G.R., Swank, A.E., Richard, A.M., and Nesnow, S. (2004). Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[a]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 827–838.

Balu, N., Padgett, W.T., Nelson, G.B., Lambert, G.R., Ross, J.A., and Nesnow, S. (2006). Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for 32P postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Anal. Biochem.* 355, 213–223.

Barber, M.F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R.I., Paredes, S., Young, N.L., Chen, K., *et al.* (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature* 487, 114–118.

Barlesi, F., Giaccone, G., Gallegos-Ruiz, M.I., Loundou, A., Span, S.W., Lefesvre, P., Kruyt, F.A., and Rodriguez, J.A. (2007). Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25, 4358–4364.

Barneda-Zahonero, B., and Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Mol. Oncol.* 6, 579–589.

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.

Bartel, D. (2004). MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.

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.

Becker, S., Soukup, J.M., and Gallagher, J.E. (2002a). Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicol Vitro* 16, 209–218.

Becker, S., Fenton, M.J., and Soukup, J.M. (2002b). Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 611–618.

Becker, S., Dailey, L.A., Soukup, J.M., Grambow, S.C., Devlin, R.B., and Huang, Y.C. (2005a). Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 113, 1032–1038.

Becker, S., Dailey, L., Soukup, J.M., Silbajoris, R., and Devlin, R.B. (2005b). TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 45–52.

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* 95, 11891–11896.

Bell, M.L., and Davis, D.L. (2001). Reassessment of the Lethal London Fog of 1952: Novel Indicators of Acute and Chronic Consequences of Acute Exposure to Air Pollution. *Health Perspect.* 109, 389–394.

Bellance, N., Lestienne, P., and Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Front. Biosci. Volume*, 4015.

Bennett, W.D., Zeman, K.L., and Kim, C. (1996). Variability of fine particle deposition in healthy adults: effect of age and gender. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1641–1647.

Bennett, W.D., Zeman, K.L., Kim, C., and Mascarella, J. (1997). Enhanced deposition of fine particles in COPD patients spontaneously breathing at rest. *Inhal. Toxicol.* 9, 1–14.

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.

Bliefer, C., and Perraud, R. (2009). *Chimie de l'environnement* (De Boeck Université, Bruxelles).

Bock, K.W., Gschaidmeier, H., Heel, H., Lehmköster, T., Münzel, P.A., Raschko, F., and Bock-Hennig, B. (1998). AH receptor-controlled transcriptional regulation and function of rat and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Adv. Enzyme Regul.* 38, 207–222.

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-

- binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA New York N 10*, 185–191.
- 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. *Env. Heal. Perspect 118*, 763–768.
- Bonetta, S., Gianotti, V., Bonetta, S., Gosetti, F., Oddone, M., Gennaro, M.C., and Carraro, E. (2009). DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere 77*, 1030–1034.
- Boulon, J. (2011). Multi-scale approach of the atmospheric new secondary particle formation.
- Brambilla, E. (2002). Classification des cancers broncho-pulmonaires (OMS 1999). *Rev. Mal. Respir. 19*, 455–466.
- Brambilla, E. (2009). [Epigenetic modifications in lung cancer]. *Ann Pathol 29 Spec No 1*, S31–S33.
- Brauer, M., Avila-Casado, C., Fortoul, T.I., Vedal, S., Stevens, B., and Churg, A. (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Env. Heal. Perspect 109*, 1039–1043.
- 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.
- Brown, L.E., Trought, K.R., Bailey, C.I., and Clemons, J.H. (2005). 2,3,7,8-TCDD equivalence and mutagenic activity associated with PM10 from three urban locations in New Zealand. *Sci Total Env. 349*, 161–174.
- Brzezińska, E., Dutkowska, A., and Antczak, A. (2012). The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol. Biol. Rep. 40*, 309–325.
- 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.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med. 29*, 222–230.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA New York N 10*, 1957–1966.
- 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. *Env. Heal. Perspect 119*, 964–969.
- Capodanno, A., Boldrini, L., Proietti, A., Ali, G., Pelliccioni, S., Niccoli, C., D’Incecco, A., Cappuzzo, F., Chella, A., Lucchi, M., *et al.* (2013). Let-7g and miR-21 expression in non-small cell lung cancer: Correlation with clinicopathological and molecular features. *Int. J. Oncol.*
- Carey, I.M., Atkinson, R.W., Kent, A.J., van Staa, T., Cook, D.G., and Anderson, H.R. (2013). Mortality Associations with Long-Term Exposure to Outdoor Air Pollution in a National English Cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. 187*, 1226–1233.
- Del Carmen, E.M., Souza, V., Bucio, L., Hernández, E., Damián-Matsumura, P., Zaga, V., and Gutiérrez-Ruiz, M.C. (2002). Cadmium induces α 1collagen (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 57 Suppl 1*, 189–204.
- Cazier, F., Dewaele, D., Delbende, A., Nouali, H., Garçon, G., Verdin, A., Courcot, D., Bouhsina, S., and Shirali, P. (2011). Sampling analysis and characterization of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas. *Procedia Environ. Sci. 4*, 218–227.
- Cesaroni, G., Badaloni, C., Gariazzo, C., Stafoggia, M., Sozzi, R., Davoli, M., and Forastiere, F. (2013). Long-term exposure to urban air pollution and mortality in a cohort of more than a million adults in Rome. *Environ. Health Perspect. 121*, 324–331.
- Chahin, A., Peiffer, J., Olry, J.-C., Crepeaux, G., Schroeder, H., Rychen, G., and Guiavarc’h, Y. (2013). EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Chem Toxicol 56*, 371–380.
- 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.

- Chavan, H., and Krishnamurthy, P. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mediate transcriptional activation of the ATP binding cassette transporter ABCB6 gene via the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *J. Biol. Chem.* *287*, 32054–32068.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 33–46.
- 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.
- Cheng, Y., Liu, X., Zhang, S., Lin, Y., Yang, J., and Zhang, C. (2009). MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *47*, 5–14.
- 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. Biomarkers Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *21*, 2252–2260.
- Christensen, B.C., Moyer, B.J., Avissar, M., Ouellet, L.G., Plaza, S.L., McClean, M.D., Marsit, C.J., and Kelsey, K.T. (2009). A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* *30*, 1003–1007.
- Churg, A., and Brauer, M. (2000). Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol* *24*, 353–361.
- Churg, A., Brauer, M., del Carmen Avila-Casado, M., Fortoul, T.I., and Wright, J.L. (2003). Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ. Health Perspect.* *111*, 714–718.
- CITEPA (2012). Rapport SECTEN, Inventaire des émissions de polluants dans l'atmosphère en France (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique).
- Claxton, L.D., Matthews, P.P., and Warren, S.H. (2004). The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat. Res* *567*, 347–399.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., and Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* *23*, 143–151.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* *17*, 1195–1214.
- Couvidat, F., Debry, É., Sartelet, K.N., and Seigneur, C. (in press). A hydrophilic/hydrophobic organic (H₂O) aerosol model: Development, evaluation and sensitivity analysis. *J. Geophys. Res.*
- Dachs, J., and Eisenreich, S.J. (2000). Adsorption onto aerosol soot carbon dominates gas–particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Env. Sci Technol* *34*, 3690–3697.
- Dai, W., Chen, H., Yu, R., He, L., Chen, B., and Chen, X. (2010). 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.* *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* *33*, 1466–1476.
- Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kotsinas, A., Gorgoulis, V., Field, J.K., and Liloglou, T. (2009). Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *124*, 81–87.
- Davis, A.P., Shokouhian, M., and Ni, S. (2001). Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere* *44*, 997–1009.
- Davison, B., O'Dowd, C., Hewitt, C.N., Smith, M.H., Harrison, R.M., Peel, D.A., Wolf, E., Mulvaney, R., Schwikowski, M., and Baltensperger, U. (1996). Dimethyl sulfide and its oxidation products in the atmosphere of the Atlantic and Southern oceans. *Atmos. Environ.* *30*, 1895–1906.
- Declercq, C., Pascal, M., Chanel, O., Corso, M., Ung, A., Pascal, L., Blanchard, M., Larrieu, S., and Medina, S. (2012). Impact sanitaire de la pollution atmosphérique dans neuf villes françaises. Résultats du projet Aphekom. (Institut de veille sanitaire).
- deKok, T.M.C.M., Drieste, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., and Briedé, J.J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res* *613*, 103–122.
- 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. *ChemRes Toxicol* *14*, 1371–1377.

- Deltour, S., Chopin, V., and Leprince, D. (2005). [Epigenetics and cancer]. *Med Sci Paris* 21, 405–411.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., and Ding, W. (2013). PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. In Vitro* 27, 1762–1770.
- Denison, M.S., and Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334.
- Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., DeGroot, D.E., and Zhao, B. (2011). Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicol. Sci.* 124, 1–22.
- 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.
- Dieme, D., Cabral-Ndior, M., Garçon, G., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Diouf, A., and Shirali, P. (2012). Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal). *Env. Res* 113, 1–13.
- 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.
- DiVinci, 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 Invest* 86, 297–303.
- Dizdaroglu, M., and Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res.* 46, 382–419.
- Dockery, D.W., Pope, C.A., 3rd, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr, and Speizer, F.E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* 329, 1753–1759.
- 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.
- Donato, M.T., Castell, J.V., and Gomez-Lechon, M.J. (1999). Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* 31, 542–549.
- DREAL (2009). Enjeux 2009 pour l'industrie du Nord - Pas de Calais. (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement).
- DREAL (2010). L'industrie au regard de l'environnement (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement).
- 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.*
- Elassouli, S.M., Alqahtani, M.H., and Milaat, W. (2007). Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and the Salmonella mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. *Int J Environ Res Public Heal.* 4, 216–233.
- Elihn, K., Berg, P., and Lidén, G. (2011). Correlation between airborne particle concentrations in seven industrial plants and estimated respiratory tract deposition by number, mass and elemental composition. *J. Aerosol Sci.* 42, 127–141.
- 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.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286–298.
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999a). Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 59, 67–70.

- Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999b). 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.
- Ezzati, M., Lopez, A.D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S., and Murray, C.J. (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *The Lancet* 360, 1347–1360.
- Falck, G.C.M., Lindberg, H.K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., and Norppa, H. (2009). Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Hum Exp Toxicol* 28, 339–352.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 269-270, 108–115.
- Fehsenfeld, F., Calvert, J., Goldan, P., Guenther, A.B., Hewitt, C.N., Lamb, B., Liu, S., Trainer, M., Westberg, H., and Zimmerman, P. (1992). Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Glob. Biogeochem. Cycles* 6, 389–430.
- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M.P., *et al.* (2003). Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat Res* 534, 45–64.
- Feng, Y., Wang, X., Xu, L., Pan, H., Zhu, S., Liang, Q., Huang, B., and Lu, J. (2009). The transcription factor ZBP-89 suppresses p16 expression through a histone modification mechanism to affect cell senescence. *FEBS J* 276, 4197–4206.
- Feng, Z., Hu, W., and Tang, M.S. (2004). Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci US* 101, 8598–8602.
- Feng, Z., Hu, W., Marnett, L.J., and Tang, M. (2006). Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 601, 125–136.
- Ferrari, R., Pellegrini, M., Horwitz, G.A., Xie, W., Berk, A.J., and Kurdistani, S.K. (2008). Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science* 321, 1086–1088.
- Ferrari, R., Su, T., Li, B., Bonora, G., Oberai, A., Chan, Y., Sasidharan, R., Berk, A.J., Pellegrini, M., and Kurdistani, S.K. (2012). Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome Res.* 22, 1212–1221.
- Finlayson-Pitts, B.J., and Pitts, J.N. (1997). Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles. *Science* 276, 1045–1052.
- Fiorito, F., Cantiello, A., Granato, G.E., Marfè, G., Ciarcia, R., Florio, S., Pagnini, U., De Martino, L., and Iovane, G. (in press). 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. In Vitro*.
- Floor, S.L., Dumont, J.E., Maenhaut, C., and Raspe, E. (2012). Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med* 18, 509–515.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R.G., and Penning, T.M. (1995). Identification of benzo[a]pyrene-7,8-dione as an authentic metabolite of (±)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in isolated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 16, 2707–2715.
- Fong, K., Sekido, Y., Gazdar, A., and Minna, J. (2003). Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58, 892–900.
- Ford, J.M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat. Res.* 577, 195–202.
- Frias, C., Pampalona, J., Genesca, A., and Tusell, L. (2012). Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci* 17, 2181–2196.
- Gabelova, A., Valovicova, Z., Bacova, G., Labaj, J., Binkova, B., Topinka, J., Sevastyanova, O., Sram, R.J., Kalina, I., Habalova, V., *et al.* (2007). Sensitivity of different endpoints for in vitro measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM10). *Mutat. Res* 620, 103–113.
- Gagou, M.E., Zuazua-Villar, P., and Meuth, M. (2010). Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Mol Biol Cell* 21, 739–752.
- Gao, W., Shen, H., Liu, L., Xu, J., Xu, J., and Shu, Y. (2011). MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 557–566.
- Garçon, G., Gosset, P., Zerimech, F., Grave-DESCAMPiaux, B., and Shirali, P. (2004). Effect of Fe(2)O(3) on the capacity of benzo(a)pyrene to induce polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 150, 179–189.

- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., and Shirali, P. (2006). Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol Vitro* 20, 519–528.
- 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.
- Gazdar, A.F., and Brambilla, E. (2010). Preneoplasia of lung cancer. *Cancer Biomarkers Sect. Dis. Markers* 9, 385–396.
- 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.
- Gilli, G., Pignata, C., Schiliro, T., Bono, R., La Rosa, A., and Traversi, D. (2007). The mutagenic hazards of environmental PM2.5 in Turin. *Environ. Res.* 103, 168–175.
- 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.
- Golebiowski, F., and Kasprzak, K.S. (2005). Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel(II). *Mol. Cell. Biochem.* 279, 133–139.
- 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.
- Greenberger, P.A. (2004). Mold-induced hypersensitivity pneumonitis. *Allergy Asthma Proc* 25, 219–223.
- Gregory, R.I., and Shiekhattar, R. (2005). MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res.* 65, 3509–3512.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Grey, C.E., and Adlercreutz, P. (2003). Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res* 527, 27–36.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., Dongen, S. van, Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–D144.
- 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.* 93, 747–758.
- Grosskopf, C., Schwerdtle, T., Mullenders, L.H.F., and Hartwig, A. (2010). Antimony impairs nucleotide excision repair: XPA and XPE as potential molecular targets. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1175–1183.
- 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.
- Gualtieri, M., Longhin, E., Mattioli, M., Mantecca, P., Tinaglia, V., Mangano, E., Proverbio, M.C., Bestetti, G., Camatini, M., and Battaglia, C. (2012). Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5. *Toxicol. Lett.* 209, 136–145.
- Gustafson, K.E., and Dickhut, R.M. (1997). Particle/gas concentrations and distributions of PAHs in the atmosphere of Southern Chesapeake Bay. *Env. Sci Technol* 31, 140–147.
- Hales, S., Blakely, T., and Woodward, A. (2012). Air pollution and mortality in New Zealand: cohort study. *J. Epidemiol. Community Health* 66, 468–473.
- Halmer, M.M., Schmincke, H.-F., and Graf, H.-F. (2002). The annual volcanic gas input into the atmosphere, in particular into the stratosphere: a global data set for the past 100 years. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 115, 511–528.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harrison, R.M., and Yin, J. (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Env.* 249, 85–101.

- Harrison, D., Hunter, M.C., Lewis, A.C., and Pio, P.W.S.T.V.N.C.A. (2001). Isoprene and monoterpene emission from the coniferous species *Abies Borisii-regis*—implications for regional air chemistry in Greece. *Atmos. Environ.* 35, 4687–4698.
- Hayes, J.D., and McMahon, M. (2001). Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 174, 103–113.
- Heegaard, N.H.H., Schetter, A.J., Welsh, J.A., Yoneda, M., Bowman, E.D., and Harris, C.C. (2012). Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130, 1378–1386.
- Heinrich, J., Thiering, E., Rzehak, P., Krämer, U., Hochadel, M., Rauchfuss, K.M., Gehring, U., and Wichmann, H.-E. (2013). Long-term exposure to NO₂ and PM₁₀ and all-cause and cause-specific mortality in a prospective cohort of women. *Occup. Environ. Med.* 70, 179–186.
- Heintzenberg, J. (1989). Fine particles in the global troposphere. A review. *Tellus* 41B, 149–160.
- Helfand, W.H., Lazarus, J., and Theerman, P. (2001). Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am. J. Public Health* 91, 553–553.
- Herman, J.G. (2004). Epigenetics in lung cancer: focus on progression and early lesions. *Chest* 125, 119S–122S.
- 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.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2007). AHR- and DNA-Damage-Mediated Gene Expression Responses Induced by Benzo(a)pyrene in Human Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.
- Hoffmann, B., Moebus, S., Dragano, N., Stang, A., Mohlenkamp, S., Schmermund, A., Memmesheimer, M., Brocker-Preuss, M., Mann, K., Erbel, R., *et al.* (2009). Chronic residential exposure to particulate matter air pollution and systemic inflammatory markers. *Environ Health Perspect* 117, 1302–1308.
- Hoffmann, I., Roatsch, M., Schmitt, M.L., Carlino, L., Pippel, M., Sippl, W., and Jung, M. (2012). The role of histone demethylases in cancer therapy. *Mol. Oncol.* 6, 683–703.
- Hou, L., Zhang, X., Tarantini, L., Nordio, F., Bonzini, M., Angelici, L., Marinelli, B., Rizzo, G., Cantone, L., Apostoli, P., *et al.* (2011a). Ambient PM exposure and DNA methylation in tumor suppressor genes: a cross-sectional study. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 25.
- Hou, L., Wang, D., and Baccarelli, A. (2011b). Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 714, 105–112.
- Hsu, S.-D., Lin, F.-M., Wu, W.-Y., Liang, C., Huang, W.-C., Chan, W.-L., Tsai, W.-T., Chen, G.-Z., Lee, C.-J., Chiu, C.-M., *et al.* (2011). miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 39, D163–169.
- Hu, W., Feng, Z., and Tang, M.-S. (2004a). Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25, 455–462.
- Hu, W., Feng, Z., and Tang, M.-S. (2004b). Chromium(VI) enhances (±)-anti-7β,8α-dihydroxy-9α, 10α-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 14282–14289.
- 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.* 10, 3215–3233.
- 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*.
- Hussain, M., Madl, P., and Khan, A. (2011). Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases. *theHealth* 2, 51–59.
- Ianovici, N., and Tudorica, D. (2009). Aeromycoflora in outdoor environment of Timisoara city (Romania). *Not. Sci. Biol.* 1, 21–28.

- ILO (2013). International Labour Organization (<http://www.ilo.org/oshenc/part-i/respiratory-system/item/326-structure-and-function>).
- INSEE (2006). Déclarations Annuelles des Données Sociales (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques).
- INSEE (2009). Recensement de la population 2009, exploitation principale. (Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques).
- Inserm (2008). Cancers-environnement (Expertise collective Inserm).
- IRCP (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.
- iREP (2010). Registre Français des Emission Polluantes (irep.gouv.fr).
- Isaacs, K.K., and Martonen, T.B. (2005). Particle deposition in children's lungs: theory and experiment. *J Aerosol Med* 18, 337–353.
- Izzotti, A., Calin, G.A., Arrigo, P., Steele, V.E., Croce, C.M., and Flora, S.D. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J* 23, 806–812.
- Jaiswal, A.K. (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29, 254–262.
- Jaques, P.A., and Kim, C.S. (2000). Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women. *Inhal Toxicol* 12, 715–731.
- 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. *Env. Heal. Perspect* 117, 1745–1751.
- Jensen, T.J., Wozniak, R.J., Eblin, K.E., Wnek, S.M., Gandolfi, A.J., and Futscher, B.W. (2009). Epigenetic mediated transcriptional activation of WNT5A participates in arsenical-associated malignant transformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 39–46.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jeon, H.-S., Choi, J.E., Jung, D.K., Choi, Y.Y., Kang, H.G., Lee, W.-K., Yoo, S.S., Lim, J.-O., and Park, J.Y. (2012). Telomerase activity and the risk of lung cancer. *J Korean Med Sci* 27, 141–145.
- Jerrett, M., Burnett, R.T., Ma, R., Pope, C.A., 3rd, Krewski, D., Newbold, K.B., Thurston, G., Shi, Y., Finkelstein, N., Calle, E.E., *et al.* (2005). Spatial analysis of air pollution and mortality in Los Angeles. *Epidemiol. Camb. Mass* 16, 727–736.
- 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.
- Ji, W., Yang, L., Yuan, J., Yang, L., Zhang, M., Qi, D., Duan, X., Xuan, A., Zhang, W., Lu, J., *et al.* (2012). MicroRNA-152 targets DNA methyltransferase 1 in NiS-transformed cells via a feedback mechanism. *Carcinogenesis* 34, 446–453.
- Jiang, L., Dai, H., Sun, Q., Geng, C., Yang, Y., Wu, T., Zhang, X., and Zhong, L. (2011). Ambient particulate matter on DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol Ind Heal.* 27, 87–95.
- 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.* 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.
- Kang, S.-M., Choi, J.-W., Hong, S.-H., and Lee, H.-J. (2013). Up-Regulation of microRNA* Strands by Their Target Transcripts. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13231–13240.
- Kanwal, R., and Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol* 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.
- Karamouzis, M.V., Konstantinopoulos, P.A., and Papavassiliou, A.G. (2007). Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Res.* 17, 324–332.
- Karlsson, H.L., Nygren, J., and Moller, L. (2004). Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat. Res* 565, 1–10.
- 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.
- Katanoda, K., Sobue, T., Satoh, H., Tajima, K., Suzuki, T., Nakatsuka, H., Takezaki, T., Nakayama, T., Nitta, H., Tanabe, K., *et al.* (2011). An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J. Epidemiol. Jpn. Epidemiol. Assoc.* 21, 132–143.
- 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.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247–254.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376–385.
- Kim, C.S., and Hu, S.C. (1998). Regional deposition of inhaled particles in human lungs: comparison between men and women. *J Appl Physiol* 84, 1834–1844.
- Kim, C.S., and Hu, S.-C. (2006). Total respiratory tract deposition of fine micrometer-sized particles in healthy adults: empirical equations for sex and breathing pattern. *J Appl Physiol* 101, 401–412.
- 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., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., and Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol Lett* 140-141, 63–74.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V., and Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 85, 873–899.
- Kitteringham, N.R., Abdullah, A., Walsh, J., Randle, L., Jenkins, R.E., Sison, R., Goldring, C.E.P., Powell, H., Sanderson, C., Williams, S., *et al.* (2010). Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *J. Proteomics* 73, 1612–1631.
- Klaassen, C.D., and Casarett, L.J. (2001). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th Edition (McGraw-Hill).
- Klaunig, J.E., and Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 239–267.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 254, 86–99.
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J., and Schins, R.P. (2002). Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* 234-235, 317–326.
- 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.
- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157–162.
- Koch, S., Winterhalter, R., Uherek, E., Kolloff, A., Neeb, P., and Moortgat, G.K. (2000). Formation of new particles in the gas-phase ozonolysis of monoterpenes. *Atmos. Environ.* 34, 4031–4042.
- Koester, C.J., and Hites, R.A. (1992). Photodegradation of polychlorinated dioxins and dibenzofurans adsorbed to fly ash. *Environ. Sci. Technol.* 26, 502–507.
- Kondo, K., Takahashi, Y., Hirose, Y., Nagao, T., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Ochiai, A., Monden, Y., and Tangoku, A. (2006). The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 53, 295–302.
- Krewski, D., Burnett, R., Jerrett, M., Pope, C.A., Rainham, D., Calle, E., Thurston, G., and Thun, M. (2005). Mortality and long-term exposure to ambient air pollution: ongoing analyses based on the American Cancer Society cohort. *J Toxicol EnvironHealth* 68, 1093–1109.
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.-G., Croce, C.M., Negrini, M., *et al.* (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1859–1867.
- Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 39, 673–677.
- Kunzli, N., Kaiser, R., Medina, S., Studnicka, M., Chanel, O., Filliger, P., Herry, M., Horak, F., J., Puybonnieux-Texier, V., Quenel, P., *et al.* (2000). Public-health impact of outdoor and traffic-related air

- pollution: a European assessment. *Lancet* 356, 795–801.
- Kurdistani, S.K. (2011). Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog Drug Res* 67, 91–106.
- Lacoste, N., and Côté, J. (2003). [The epigenetic code of histones]. *Med Sci Paris* 19, 955–959.
- Laden, F., Schwartz, J., Speizer, F.E., and Dockery, D.W. (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 667–672.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.
- Lans, H., Marteiijn, J.A., and Vermeulen, W. (2012). ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics Chromatin* 5, 4.
- 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.
- Lazaridis, M., Broday, D.M., Hov, O., and Georgopoulos, P.G. (2001). Integrated exposure and dose modeling and analysis system. 3. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract. *Env. Sci Technol* 35, 3727–3734.
- Lee, M.-W., Chen, M.-L., Lung, S.-C.C., Tsai, C.-J., Lai, C.-F.S., Yang, S.-C., and Mao, I.-F. (2012). Increase of urinary concentrations of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in diesel exhaust emission inspector exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85, 273–282.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.
- Lei, Y.-C., Hwang, J.-S., Chan, C.-C., Lee, C.-T., and Cheng, T.-J. (2005). Enhanced oxidative stress and endothelial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats exposed to fine particles. *Environ. Res.* 99, 335–343.
- Lemos, M., Diaz, E.A., Gupta, T., Kang, C.-M., Ruiz, P., Coull, B.A., Godleski, J.J., and Gonzalez-Flecha, B. (2011). Cardiac and pulmonary oxidative stress in rats exposed to realistic emissions of source aerosols. *Inhal. Toxicol.* 23, 75–83.
- Lennartsson, A., and Ekwall, K. (2009). Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1790, 863–868.
- Lepeule, J., Laden, F., Dockery, D., and Schwartz, J. (2012). Chronic Exposure to Fine Particles and Mortality: An Extended Follow-up of the Harvard Six Cities Study from 1974 to 2009. *Environ. Health Perspect.* 120, 965–970.
- Levine, J.S., Augustsson, T.R., Andersont, I.C., and Hoell, J.M. (1984). Tropospheric sources of NOx: Lightning and biology. *Atmos. Environ.* 18, 1797–1804.
- 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.
- Li, H., Swiercz, R., and Englander, E.W. (2009). Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *J. Neurochem.* 110, 1774–1783.
- Li, Y., Aneja, V.P., Arya, S.P., Rickman, J., Brittig, J., Roelle, P., and Kim, D.-S. (1999). Nitric oxide emission from intensively managed agricultural soil in North Carolina. *J. Geophys. Res.* 104, 26126–26155.
- Li, Z., Kleinstreuer, C., and Zhang, Z. (2007). Simulation of airflow fields and microparticle deposition in realistic human lung airway models. Part II: Particle transport and deposition. *Eur. J. Mech. BFluids* 26, 650–668.
- Lin, Y., Liu, X., Cheng, Y., Yang, J., Huo, Y., and Zhang, C. (2009). Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 284, 7903–7913.
- Ling, H., Sayer, J.M., Plosky, B.S., Yagi, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., Jerina, D.M., and Yang, W. (2004). Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2265–2269.

- 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.
- Liu, Z.-L., Wang, H., Liu, J., and Wang, Z.-X. (2013). MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Mol. Cell. Biochem.* *372*, 35–45.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Logan, W.P.D. (1953). Mortality in the London fog incident, 1952. *Lancet* *1*, 336–338.
- Lohse, B., Kristensen, J.L., Kristensen, L.H., Agger, K., Helin, K., Gajhede, M., and Clausen, R.P. (2011). Inhibitors of histone demethylases. *Bioorg. Med. Chem.* *19*, 3625–3636.
- Löndahl, J., Swietlicki, E., Rissler, J., Bengtsson, A., Boman, C., Blomberg, A., and Sandström, T. (2012). Experimental determination of the respiratory tract deposition of diesel combustion particles in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol* *9*, 30.
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., and Gualtieri, M. (2013). Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *27*, 551–559.
- Lu, Y., Govindan, R., Wang, L., Liu, P. -y., Goodgame, B., Wen, W., Sezhiyan, A., Pfeifer, J., Li, Y. -f., Hua, X., *et al.* (2012). MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer. *Carcinogenesis* *33*, 1046–1054.
- Luckert, C., Ehlers, A., Buhrke, T., Seidel, A., Lampen, A., and Hessel, S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicol. Lett.*
- Lugade, A.A., Bogner, P.N., and Thanavala, Y. (2011). Murine model of chronic respiratory inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* *780*, 125–141.
- 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.
- Luo, H.Y., and Liu, Y. (2009). Particle deposition in a CT-scanned human lung airway. *J Biomech* *42*, 1869–1876.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 512–517.
- Madanayake, T.W., Fidler, T.P., Fresquez, T.M., Bajaj, N., and Rowland, A.M. (2012). Cytochrome P450 2S1 Depletion Enhances Cell Proliferation and Migration in Bronchial Epithelial Cells, in Part, through Modulation of Prostaglandin E2 Synthesis. *Drug Metab Dispos* *40*, 2119–2125.
- Maeda, T., Nakamura, R., Kadokami, K., and Ogawa, H.I. (2007). Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. *Env. Toxicol Chem* *26*, 237–241.
- Magnaldo, T. (2004). La «guerre» du NER (nucleotide excision repair). *MS Médecine Sci.* *20*, 268–270.
- 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.
- Markou, A., Sourvinou, I., Vorkas, P.A., Yousef, G.M., and Lianidou, E. (2013). Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.*
- Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* *113*, 173–215.
- 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.
- Matsumoto, Y., Ide, F., Kishi, R., Akutagawa, T., Sakai, S., Nakamura, M., Ishikawa, T., Fujii-Kuriyama, Y., and Nakatsuru, Y. (2007). Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ. Sci. Technol.* *41*, 3775–3780.
- McCoull, K.D., Rindgen, D., Blair, I.A., and Penning, T.M. (1999). Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* *12*, 237–246.
- McDonnell, W.F., Nishino-Ishikawa, N., Petersen, F.F., Chen, L.H., and Abbey, D.E. (2000). Relationships of mortality with the fine and coarse fractions of long-term ambient PM10 concentrations

- in nonsmokers. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **10**, 427–436.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Chanas, S.A., Henderson, C.J., McLellan, L.I., Wolf, C.R., Cavin, C., and Hayes, J.D. (2001). The Cap “n” Collar Basic Leucine Zipper Transcription Factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) Controls Both Constitutive and Inducible Expression of Intestinal Detoxification and Glutathione Biosynthetic Enzymes. *Cancer Res.* **61**, 3299–3307.
- McMeeking, G.R., Kreidenweis, S.M., Baker, S., Carrico, C.M., Chow, J.C., Collett, J.L., Hao, W.M., Holden, A.M., Kirchstetter, T.W., Moosmüller, W.C.M.H., *et al.* (2009). Emissions of trace gases and aerosols during the open combustion of biomass in the laboratory. *J. Geophys. Res.* **114**, D19210.
- MEDDE (2010). Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l’air.
- MEDDE (2013). Base des Installations Classées (Ministère de l’Ecologie, du Développement Durable et de l’Energie).
- Mehta, M., Chen, L.C., Gordon, T., Rom, W., and Tang, M.S. (2008). Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat. Res.* **657**, 116–121.
- Melo, S.A., and Esteller, M. (2011). Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett* **585**, 2087–2099.
- Meng, Z., and Zhang, Q. (2007). Damage effects of dust storm PM2.5 on DNA in alveolar macrophages and lung cells of rats. *Food Chem Toxicol* **45**, 1368–1374.
- Merhi, M., Dombu, C.Y., Brient, A., Chang, J., Platel, A., Curieux, F.L., Marzin, D., Nessler, F., and Betbeder, D. (2012). Study of serum interaction with a cationic nanoparticle: Implications for in vitro endocytosis, cytotoxicity and genotoxicity. *Int J Pharm* **423**, 37–44.
- 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.
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., and Batist, G. (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related Factor (NRF2) expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **280**, 20340–20348.
- Miao, Y., Li, J., Qiu, X., Li, Y., Wang, Z., and Luan, Y. (2013). miR-27a regulates the self renewal of the H446 small cell lung cancer cell line in vitro. *Oncol. Rep.* **29**, 161–168.
- Misra, R.R., and Waalkes, M. (2011). Genetic Toxicology. In *Mechanisms of Toxicity*, E. Silbergeld, ed. (Geneva, Switzerland),.
- Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). The Pathways of Double-Strand Break Repair. In *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, F. Storici, ed. (InTech),.
- Nannelli, A., Rossignolo, F., Tolando, R., Rossato, P., Longo, V., and Gervasi, P.G. (2009). Effect of β -naphthoflavone on AhR-regulated genes (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2S1, Nrf2, and GST) and antioxidant enzymes in various brain regions of pig. *Toxicology* **265**, 69–79.
- 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 Env.* **408**, 1403–1413.
- Navrátil, T., Hladil, J., Strnad, L., Koptíková, L., and Skála, R. (in press). Volcanic ash particulate matter from the 2010 Eyjafjallajökull eruption in dust deposition at Prague, central Europe. *Aeolian Res.*
- 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.
- Nebert, D.W., Puga, A., and Vasiliou, V. (1993). Role of the Ah Receptor and the Dioxin-Inducible [Ah] Gene Battery in Toxicity, Cancer, and Signal Transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**, 624–640.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., and Dalton, T.P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65–85.
- Nemery, B., Hoet, P.H., and Nemmar, A. (2001). The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet* **357**, 704–708.
- Niestroy, J., Barbara, A., Herbst, K., Rode, S., van Liempt, M., and Roos, P.H. (2011). Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **25**, 671–683.
- Nioi, P., and Hayes, J.D. (2004). Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix

- transcription factors. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 555, 149–171.
- Noland, C.L., and Doudna, J.A. (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA New York N* 19, 639–648.
- Novo, E., and Parola, M. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 1, 5.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *EnvironHealth Perspect* 113, 823–839.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A.C.P. (2000). Acute Pulmonary Effects of Ultrafine Particles in Rats and Mice (Health Effects Institute).
- Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., and Chung, K.H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat Res* 723, 142–151.
- Ohnishi, S., and Kawanishi, S. (2002). Double base lesions of DNA by a metabolite of carcinogenic benzo[a]pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 778–782.
- 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.
- Olaussen, K.A., Dubrana, K., Domont, J., Spano, J.-P., Sabatier, L., and Soria, J.-C. (2006). Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 57, 191–214.
- Olvera, H.A., Perez, D., Clague, J.W., Cheng, Y.-S., Li, W.-W., Amaya, M.A., Burchiel, S.W., Berwick, M., and Pingitore, N.E. (2012). The effect of ventilation, age, and asthmatic condition on ultrafine particle deposition in children. *Pulm Med* 2012, 736290.
- OMS (2002). The world health report: reducing risk promoting healthy life (World Health Organization, Geneva, Switzerland).
- OMS (2003). Health risks of persistent organic pollutants from long-range transboundary air pollution (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).
- Ovrevik, J., Arlt, V.M., Oya, E., Nagy, E., Mollerup, S., Phillips, D.H., Lag, M., and Holme, J.A. (2010). Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol ApplPharmacol* 242, 270–280.
- Pakotiprapha, D., Samuels, M., Shen, K., Hu, J.H., and Jeruzalmi, D. (2012). Structure and mechanism of the UvrA–UvrB DNA damage sensor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 291–298.
- Park, J.-H., Troxel, A.B., Harvey, R.G., and Penning, T.M. (2006). PAH o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 719–728.
- Pastorková, A., Cerná, M., Smíd, J., and Vrbíková, V. (2004). Mutagenicity of airborne particulate matter PM₁₀. *Cent Eur J Public Heal.* 12 *Suppl*, S72–S75.
- Patton, J.S., and Byron, P.R. (2007). Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat Rev Drug Discov* 6, 67–74.
- Pavanello, S., Pesatori, A.-C., Dioni, L., Hoxha, M., Bollati, V., Siwinska, E., Mielzynska, 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.
- Peng, C., Arthur, D., Liu, F., Lee, J., Xia, Q., Lavin, M.F., and Ng, J.C. (2013). Genotoxicity of hydroquinone in A549 cells. *Cell Biol. Toxicol.*
- 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. *ChemBiol 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.
- Perrone, M.G., Gualtieri, M., Consonni, V., Ferrero, L., Sangiorgi, G., Longhin, E., Ballabio, D., Bolzacchini, E., and Camatini, M. (2013). Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or remote site origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary cells. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 176, 215–227.
- Peserico, A., and Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein

- acetylation balance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 371832.
- Petersen, I. (2011). The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Dtsch Arztebl Int* 108, 525–531.
- Pfeifer, P., Voss, M., Wonnenberg, B., Hellberg, J., Seiler, F., Lepper, P.M., Bischoff, M., Langer, F., Schäfers, H.-J., Menger, M.D., *et al.* (2013). IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 415–421.
- Pietrodangelo, A., Salzano, R., Rantica, E., and Perrino, C. (2013). Characterisation of the local topsoil contribution to airborne particulate matter in the area of Rome (Italy). *Source profiles. Atmos. Environ.* 69, 1–14.
- 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.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., and Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr. Clin. Métabolisme* 16, 233–239.
- Plummer, L.E., Ham, W., Kleeman, M.J., Wexler, A., and Pinkerton, K.E. (2012). Influence of season and location on pulmonary response to California's San Joaquin Valley airborne particulate matter. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75, 253–271.
- Poma, A., Arrizza, L., Picozzi, P., and Spanò, L. (2002). Monitoring urban air particulate matter (fractions PM 2.5 and PM 10) genotoxicity by plant systems and human cells in vitro: a comparative analysis. *Teratog Carcinog Mutagen* 22, 271–284.
- Poma, A., Limongi, T., Pisani, C., Granato, V., and Picozzi, P. (2006). Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. *Toxicol Vitro* 20, 1023–1029.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., and Thurston, G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132–1141.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thurston, G.D., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., and Godleski, J.J. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109, 71–77.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Krewski, D., Jerrett, M., Shi, Y., Calle, E.E., and Thun, M.J. (2009). Cardiovascular mortality and exposure to airborne fine particulate matter and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationship. *Circulation* 120, 941–948.
- Pope, C.A., 3rd, Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Dockery, D.W., Evans, J.S., Speizer, F.E., and Heath, C.W., Jr (1995). Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 669–674.
- Postel-Vinay, S., Vanhecke, E., Olausson, K.A., Lord, C.J., Ashworth, A., and Soria, J.-C. (2012). The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 144–155.
- Préfaut, C. (1998). *L'essentiel en physiologie respiratoire* (Sauramps Médical).
- 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.
- Querol, X., Alastuey, A., Viana, M.M., Rodriguez, S., Artinano, B., Salvador, P., Santos, S.G. do, Patier, R.F., Ruiz, C.R., Rosa, J. de la, *et al.* (2004). Speciation and origin of PM10 and PM2.5 in Spain. *Aerosol Sci.* 35, 1151–1172.
- Quevauvillers (2004). *Dictionnaire Médical* (Masson).
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Brunekreef, B., *et al.* (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813–822.
- Raddatz, G., Gao, Q., Bender, S., Jaenisch, R., and Lyko, F. (2012). Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS Genet.* 8, e1003146.
- Rana, S.V.S., and Verma, Y. (2005). Biochemical toxicity of benzene. *J. Environ. Biol. Acad. Environ. Biol. India* 26, 157–168.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiothérapie J. Société Française Radiothérapie Oncol.* 16, 1–10.
- 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.

- Reddy, M.V., and Randerath, K. (1986). Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1543–1551.
- Risch, A., and Plass, C. (2008). Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 123, 1–7.
- Risom, L., Moller, 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.
- Rivera, S.P., Saarikoski, S.T., and Hankinson, O. (2002). Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 61, 255–259.
- Rivera, S.P., Wang, F., Saarikoski, S.T., Taylor, R.T., Chapman, B., Zhang, R., and Hankinson, O. (2007). A Novel Promoter Element Containing Multiple Overlapping Xenobiotic and Hypoxia Response Elements Mediates Induction of Cytochrome P450_{2S1} by Both Dioxin and Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 282, 10881–10893.
- Roelle, P.A., Aneja, V.P., Gay, B., Geron, C., and Pierce, T. (2001). Biogenic nitric oxide emissions from cropland soils. *Atmos. Environ.* 35, 115–124.
- 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.
- Ross, D. (2004). Quinone Reductases Multitasking in the Metabolic World. *Drug Metab. Rev.* 36, 639–654.
- Rossetto, D., Avvakumov, N., and Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 7, 1098–1108.
- Rossi, J.J. (2005). RNAi and the P-body connection. *Nat. Cell Biol.* 7, 643–644.
- Rossmann, T.G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: An integrated approach. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 533, 37–65.
- Roubicek, D.A., Gutiérrez-Castillo, M.E., Sordo, M., Cebrián-García, M.E., and Ostrosky-Wegman, P. (2007). Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 631, 9–15.
- Rushmore, T.H., and Kong, A.-N.T. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 3, 481–490.
- Rushmore, T.H., King, R.G., Paulson, K.E., and Pickett, C.B. (1990). Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3826–3830.
- Rusiecki, J.A., Baccarelli, A., Bollati, V., Tarantini, L., Moore, L.E., and Bonfeld-Jorgensen, E.C. (2008). Global DNA hypomethylation is associated with high serum-persistent organic pollutants in Greenlandic Inuit. *Environ. Health Perspect.* 116, 1547–1552.
- Rylander, T., Neve, E.P.A., Ingelman-Sundberg, M., and Oscarson, M. (2001). Identification and Tissue Distribution of the Novel Human Cytochrome P450 2S1 (CYP2S1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 529–535.
- Saarikoski, S.T., Wikman, H.A., Smith, G., Wolff, C.H., and Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). Localization of cytochrome P450 CYP2S1 expression in human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Histochem.* 53, 549–556.
- Saito, K., Kawakami, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., and Minamoto, T. (2010). Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 2418–2426.
- Sawicka, A., and Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94, 2193–2201.
- 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.
- Schwerdtle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L.H.F., and Hartwig, A. (2010). Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 432–442.
- Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., and Bonner, W.M. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res.* 704, 152–159.
- Seinfeld, J.H., and Pandis, S.N. (1998). *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change* (Wiley).

- Seligson, D.B., Horvath, S., McBrian, M.A., Mah, V., Yu, H., Tze, S., Wang, Q., Chia, D., Goodglick, L., and Kurdستاني, S.K. (2009). Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol* *174*, 1619–1628.
- Seoane, A.I., and Dulout, F.N. (2001). Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* *490*, 99–106.
- SET (2013). Portail Santé Environnement Travail (<http://www.sante-environnement-travail.fr/>).
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 27–36.
- Sheets, P.L., Yost, G.S., and Carlson, G.P. (2004). Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J Biochem Mol Toxicol* *18*, 92–99.
- Shen, H.D., and Han, S.H. (1998). Characterization of allergens of *Penicillium* and *Aspergillus* species. *J Microbiol Immunol Infect* *31*, 141–145.
- Shen, G., Wei, S., Zhang, Y., Wang, B., Wang, R., Shen, H., Li, W., Huang, Y., Chen, Y., Chen, H., *et al.* (in press). Emission and size distribution of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from residential wood combustion in rural China. *Biomass Bioenergy*.
- Shen, S., Lee, J., Weinfeld, M., and Le, X.C. (2008). Attenuation of DNA damage-induced p53 expression by arsenic: a possible mechanism for arsenic co-carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* *47*, 508–518.
- 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.
- Shiraishi, A., Sakumi, K., and Sekiguchi, M. (2000). Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis* *21*, 1879–1883.
- Shou, M., Harvey, R.G., and Penning, T.M. (1993). Reactivity of Benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis* *14*, 475–482.
- 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.
- Sienra, M., Rosazza, N.G., and Préndez, M. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric Res.* *75*, 267–281.
- Simpson, D., Winiwarter, W., Börjesson, G., Cinderby, S., Ferreira, A., Guenther, A., Hewitt, C.N., Janson, R., Khalil, M.A.K., Owen, S., *et al.* (1999). Inventorying emissions from nature in Europe. *J. Geophys. Res.* *104*, 8113–8152.
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., and Hower, A. (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* *252*, 326–328.
- Smith, G., Wolf, C.R., Deeni, Y.Y., Dawe, R.S., Evans, A.T., Comrie, M.M., Ferguson, J., and Ibbotson, S.H. (2003). Cutaneous expression of cytochrome P450 CYP2S1: individuality in regulation by therapeutic agents for psoriasis and other skin diseases. *The Lancet* *361*, 1336–1343.
- 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.
- Solomides, C.C., Evans, B.J., Navenot, J.-M., Vadigepalli, R., Peiper, S.C., and Wang, Z. (2012). MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis. *Acta Cytol.* *56*, 645–654.
- Song, E.Q., Ma, X.Y., Tian, X.G., Liu, J., Liu, L.C., Dong, H., and Song, Y. (2013). The effect of the structure of polychlorinated biphenyls on their hydroxylation, oxidation, and glutathionyl conjugation reactions. *Biomed. Environ. Sci.* *BES* *26*, 138–147.
- Sorsa, M. (2011). Genotoxic Chemicals. In *Biological Monitoring*, F. La Ferla, and R.R. Lauwerys, eds. (Geneva, Switzerland).
- Sosnowski, T.R., Moskal, A., and Gradon, L. (2007). Mechanisms of aerosol particle deposition in the Oropharynx under non-steady airflow. *Ann Occup Hyg* *51*, 19–25.
- Soukup, J.M., and Becker, S. (2001). Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol* *171*, 20–26.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* *11*, 1105–1112.

- 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. Heal.* **48**, 261–266.
- Suzuki, M., Shiraishi, K., Eguchi, A., Ikeda, K., Mori, T., Yoshimoto, K., Ohba, Y., Yamada, T., Ito, T., Baba, Y., *et al.* (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **29**, 1308–1314.
- Symonds, R.B., Rose, W.I., Bluth, G.J.S., and Gerlach, T.M. (1994). Volcanic-gas studies; methods, results, and applications. *Rev. Miner. Geochem.* **30**, 1–66.
- Szaefer, H., Krajka-Kuźniak, V., and Baer-Dubowska, W. (2008). The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols. *Toxicology* **251**, 28–34.
- 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.
- Tarantini, L., Bonzini, M., Apostoli, P., Pegoraro, V., Bollati, V., Marinelli, B., Cantone, L., Rizzo, G., Hou, L., Schwartz, J., *et al.* (2009). Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ. Health Perspect.* **117**, 217–222.
- Teubner, W., Meinl, W., and Glatt, H. (2002). Stable expression of rat sulfotransferase 1B1 in V79 cells: activation of benzylic alcohols to mutagens. *Carcinogenesis* **23**, 1877–1884.
- Thrane, K.E., and Mikalsen, A. (1981). High-volume sampling of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons using glass fibre filters and polyurethane foam. *Atmos. Environ.* **15**, 909–918.
- Tobin, M.J., Chadha, T.S., Jenouri, G., Birch, S.J., Gazeroglu, H.B., and Sackner, M.A. (1983). Breathing patterns. 2. Diseased subjects. *Chest* **84**, 286–294.
- Toyooka, T., Ohnuki, G., and Ibuki, Y. (2008). Solar-simulated light-exposed benzo[a]pyrene induces phosphorylation of histone H2AX. *Mutat Res* **650**, 132–139.
- Trachsel, S., Purkabiri, K., Loup, O., Jenni, H., Eberle, B., Ochs, M., and Kadner, A. (2011). High-Quality Lung Fixation by Controlled Closed Loop Perfusion for Stereological Analysis in a Large Animal Model. *J. Surg. Res.* **166**, e97–e102.
- Traversi, D., Degan, R., De Marco, R., Gilli, G., Pignata, C., Villani, S., and Bono, R. (2009). Mutagenic properties of PM2.5 urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ.Int* **35**, 905–910.
- Traversi, D., Schilirò, T., Degan, R., Pignata, C., Alessandria, L., and Gilli, G. (2011). Involvement of nitro-compounds in the mutagenicity of urban Pm2.5 and Pm10 in Turin. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **726**, 54–59.
- Travis, W.D., Brambilla, E., and Müller-Hermeling, K. (2004). Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart (OMS).
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y., Beer, D.G., Powell, C.A., Riely, G.J., Schil, P.E.V., *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* **6**, 244–285.
- Turner, M.C., Krewski, D., Pope, C.A., 3rd, Chen, Y., Gapstur, S.M., and Thun, M.J. (2011). Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 1374–1381.
- UPMC (2009). Serveur d'images d'histologie - Université Pierre et Marie Curie (<http://www.edu.upmc.fr/histologie/>).
- Uppstad, H., Ovrebo, S., Haugen, A., and Mollerup, S. (2010). Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol Lett* **192**, 221–228.
- Val, S., Liousse, 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., Vlahogiannis, T., Bakeas, E.B., Triantafillaki, S., Paraskevopoulou, V., and Dassenakis, M. (2006). Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). *Chemosphere* **65**, 760–768.
- 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 EnvironSci Heal. C EnvironCarcinogEcotoxicolRev* **26**, 339–362.
- 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.
- VandenBerg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., *et al.* (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Env. Heal. Perspect* **106**, 775–792.
- Vardar, N., Tasdemir, Y., Odabasi, M., and Noll, K.E. (2004). Characterization of atmospheric concentrations and partitioning of PAHs in the Chicago atmosphere. *Sci Total Env.* **327**, 163–174.
- Vattanasit, U., Navasumrit, P., Khadka, M.B., Kanitwithayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H., and Ruchirawat, M. (2013). Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*
- Venkataraman, C., and Friedlander, S.K. (1994). Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon. 2: ambient measurements and effects of atmospheric processes. *Env. Sci Technol* **28**, 563–572.
- Vergoulis, T., Vlachos, I.S., Alexiou, P., Georgakilas, G., Maragkakis, M., Reczko, M., Gerangelos, S., Koziris, N., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2011). TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **40**, D222–D229.
- Vicente, A., Alves, C., Calvo, A.I., Fernandes, A.P., Nunes, T., Monteiro, C., Almeida, S.M., and Pio, C. (2013). Emission factors and detailed chemical composition of smoke particles from the 2010 wildfire season. *Atmos. Environ.* **71**, 295–303.
- Vlachos, I.S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis, M., Paraskevopoulou, M.D., Prionidis, K., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2012). DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res.* **40**, W498–504.
- Vondráček, J., Krčmář, P., Procházková, J., Trileciová, L., Gavelová, M., Skálová, L., Sztóráková, B., Bunček, M., Radilová, H., Kozubík, A., *et al.* (2009). The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem. Biol. Interact.* **180**, 226–237.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., and Beyersmann, D. (2003). Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**, 95–117.
- Wang, B., Robertson, L.W., Wang, K., and Ludewig, G. (2011a). Species difference in the regulation of cytochrome P450 2S1: lack of induction in rats by the aryl hydrocarbon receptor agonist PCB126. *Xenobiotica* **41**, 1031–1043.
- Wang, Q., Li, D.-C., Li, Z.-F., Liu, C.-X., Xiao, Y.-M., Zhang, B., Li, X.-D., Zhao, J., Chen, L.-P., Xing, X.-M., *et al.* (2011b). Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen. *Oncogene* **30**, 3875–3886.
- 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.
- Wang, Y., Li, J., Tong, L., Zhang, J., Zhai, A., Xu, K., Wei, L., and Chu, M. (2013). The Prognostic Value of miR-21 and miR-155 in Non-small-cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Jpn. J. Clin. Oncol.*
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., *et al.* (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* **40**, 897–903.
- Ward, D.E., and Hardy, C.C. (1991). Smoke emissions from wildland fires. *Environ. Int.* **17**, 117–134.
- 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.
- Whitby, K.T., and Cantrell, B.K. (1976). *Atmospheric Aerosols: Characteristics and Measurement.* (Las Vegas, NV),.
- Wiencke, J.K., Zheng, S., Morrison, Z., and Yeh, R.-F. (2007). Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene* **27**, 2412–2421.
- Winter, S., and Fischle, W. (2010). Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem* **48**, 45–61.
- Wise, S.S., Holmes, A.L., Xie, H., Thompson, W.D., and Wise, J.P., Sr (2006). Chronic exposure to particulate chromate induces spindle assembly checkpoint bypass in human lung cells. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1492–1498.
- Wu, S.P., Tao, S., and Liu, W.X. (2006). Particle size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in

rural and urban atmosphere of Tianjin, China. *Chemosphere* 62, 357–367.

Wyatt, H.D.M., West, S.C., and Beattie, T.L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 38, 5609–5622.

Xu, C., Li, C.Y., and Kong, A.N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch PharmRes* 28, 249–268.

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 ApplPharmacol* 221, 13–20.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.

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. 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, J., Wu, L., Chan, H.-K., and Watanabe, W. (2011). Formation, characterization, and fate of

inhaled drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 441–455.

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 Heal.* 45, 23–30.

Zhang, Z., Kleinstreuer, C., Donohue, J.F., and Kim, C.S. (2005). Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model. *Aerosol Sci.* 36, 211–233.

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.

Titre : Recherche *in vitro* des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particulaires (PM_{2.5}) industriels, urbains et ruraux.

Résumé : Les particules fines (PM_{2.5}) présentes dans l'air extérieur peuvent être inhalées puis retenues au niveau pulmonaire, conduisant à l'apparition ou à l'aggravation de différentes pathologies cardio-respiratoires. La composition complexe des PM_{2.5} rend d'autant plus difficile l'étude de leurs mécanismes d'action. Cette thèse s'inscrit donc dans une démarche d'identification des processus impliqués dans un éventuel potentiel cancérigène des PM_{2.5}, en lien avec leur composition chimique.

Nous avons étudié la toxicité de six échantillons de PM_{2.5} collectés sous influence industrielle, urbaine ou rurale au cours des saisons printemps-été 2008 et automne-hiver 2008-2009. L'étude de la fraction biologique a révélé la diversité et la richesse des particules en contaminants fongiques et bactériens. Le test d'Ames nous a permis de mettre en évidence une forte mutagénicité des PM_{2.5}, vraisemblablement liée aux composés nitro-aromatiques. Sur la base de tests de cytotoxicité préalables, nous avons étudié l'effet de 3,75 et 15 µg / cm² de particules sur la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B. Nous avons mis en évidence une induction génique de différentes enzymes impliquées dans l'activation métabolique des hydrocarbures aromatiques polycycliques, associée à une augmentation d'activité catalytique. Cette induction semble conduire à la formation d'adduits encombrants à l'ADN. De plus, les PM_{2.5} induisent des cassures simple- et double-brin de l'ADN, la formation de micronoyaux, ainsi que des perturbations de l'activité télomérase. Ces effets génotoxiques sont associés à des altérations épigénétiques que sont une hyperméthylation du promoteur de *P16^{INK4A}*, des modifications post-traductionnelles de l'histone 3 et des changements dans l'expression des miRNA étudiés. Considérant l'influence de la composition des PM_{2.5}, les composés organiques semblent être responsables des effets génotoxiques les plus importants, alors que les métaux paraissent avoir des effets épigénétiques supérieurs.

En conclusion, il apparaît que les échantillons de PM_{2.5} étudiés, de par l'action conjointe de leurs fractions organique et inorganique, sont susceptibles d'induire *in vitro* de multiples lésions décrites dans les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse broncho-pulmonaire

Mots-clés : pollution atmosphérique ; PM_{2.5} ; composition ; variations saisonnières ; sites de prélèvement ; lignée BEAS-2B ; activation métabolique ; génotoxicité ; épigénétique.

Title: *In vitro* study of PM_{2.5} samples from industrial, urban, or rural area: looking for toxicity mechanisms

Abstract: Fine airborne particulate matter (PM_{2.5}) can be inhaled and retained in deep lung for long periods, leading to onset or exacerbation of cardio-respiratory diseases. However, the complex composition of PM_{2.5} makes difficult the study of their mechanisms of action. This work fits into a global approach aiming to identify the toxicity mechanisms involved in a putative PM_{2.5} carcinogenicity, in association with PM composition.

We studied six PM samples collected either under industrial, urban, or rural area, in spring-summer 2008 or autumn-winter 2008-2009 seasons. Biological fraction analysis revealed numerous and diverse bacterial and fungal components. We carried out Ames tests revealing a high mutagenic potency for PM samples, presumably linked to their nitro-aromatic content. Based on previous cytotoxicity assays, we studied PM effect on bronchial epithelial cell line BEAS-2B, at two concentrations (3.75 and 15µg/cm²). We demonstrated gene induction of several xenobiotic metabolizing enzymes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons metabolic activation. This was associated with an increase in their catalytic activity, leading to bulky DNA-adducts formation in exposed cells. Furthermore, PM_{2.5} lead to DNA single- and double-strand breaks, micronuclei formation, and disturbed telomerase activity. In addition to these genotoxic effects, our study revealed epigenetic alterations such as *P16^{INK4A}* promoter hypermethylation, histone 3 post-translational modifications, and miRNAs expression changes. Considering the impact of chemical composition on PM toxicity, organic compounds lead to the highest genotoxicity, whereas metals seem to induce more pronounced epigenetic modifications.

Altogether, our results indicate that the studied PM_{2.5} samples, through cooperative action of organic and inorganic fractions, may lead *in vitro* to multiple alterations involved in initiation and promotion steps toward pulmonary carcinogenesis.

Keywords: air pollution; PM_{2.5}; composition; seasonal variations; sampling sites; BEAS-2B cell line; metabolic activation; genotoxicity ; epigenetics.

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 Pirouz SHIRALI & Dr Sylvain BILLET