



**HAL**  
open science

# Impact de la pollution particulaire sur la cancérogenèse pulmonaire : relation entre caractéristiques physicochimiques et mécanismes toxicologiques

Bérénice Leclercq

## ► To cite this version:

Bérénice Leclercq. Impact de la pollution particulaire sur la cancérogenèse pulmonaire : relation entre caractéristiques physicochimiques et mécanismes toxicologiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S043 . tel-01557544

**HAL Id: tel-01557544**

**<https://theses.hal.science/tel-01557544>**

Submitted on 6 Jul 2017

**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 de Lille 2 Droit et Santé  
École Doctorale Biologie-Santé de Lille

## **THÈSE DE DOCTORAT**

Présentée par

**Bérénice LECLERCQ**

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur d'Université**

**Spécialité** : Pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de  
santé

**Impact de la pollution particulaire sur la  
cancérogenèse pulmonaire : Relation entre  
caractéristiques physicochimiques et mécanismes  
toxicologiques.**

Soutenue publiquement le 12 décembre 2016

Devant le jury composé de :

**Président** : Pr Arnaud SCHERPEREEL

**Rapporteurs** : Pr Armelle BAEZA

Pr Camille DUMAS

**Examineur** : Dr Sophie ACHARD

**Directeurs de Thèse** : Pr Guillaume GARCON et Pr Patrice CODDEVILLE



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse. Je remercie le Pr Scherpereel, le Pr Baeza, le Pr Dumat et le Dr Achard d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie la région Nord-Pas de Calais et l'Ecole des mines de Douai pour avoir financé ma thèse. Je remercie l'INCA et l'INSERM pour le financement du projet PARTICLES qui a adossé ma thèse.

Merci à mon directeur de thèse, Guillaume Garçon pour m'avoir fait confiance durant ces 3 années et m'avoir donné une certaine liberté dans l'orientation de mes travaux. Merci pour ce que vous m'avez apporté et pour votre bonne humeur à toute épreuve. Je remercie aussi mon deuxième directeur de thèse, Patrice Coddeville, pour m'avoir accueillie au sein du département SAGE et permise de travailler dans un cadre pluridisciplinaire à l'école des mines de Douai. Un grand merci à mon encadrant, Laurent Alleman, pour m'avoir initiée à la chimie de l'atmosphère, pour son aide précieuse et sa disponibilité. Sans oublier Jean-Marc Lo Guidice pour m'avoir accueillie dans son équipe, je le remercie pour sa disponibilité.

Je tiens à adresser un remerciement tout particulier à Mélanie qui a toujours été là à mes côtés pour m'aider et me soutenir dans les difficultés. Merci pour ta bonne humeur, tes petites blagues « carambar » qui ne font pas rire mais qui mettent la patate quand même ! Merci à Edmone pour nos petits repas bien sympas tous les midis, merci pour ton écoute et tes conseils ! Merci à Yara, même si cela ne fait qu'un an qu'on se connaît on a bien ri !!! je n'oublierai jamais ta bonne humeur, les fous rires qu'on a eus et accessoirement les échanges scientifiques bien constructifs. Je remercie ma petite Paola alias Pao qui m'a aidée à survivre dans la jungle de la thèse, merci pour tes conseils et pour tous les moments passés ensemble. Tu seras et resteras toujours la chercheuse de référence ! Je remercie Fanny pour nos rigolades. Sans oublier Fatou, tu as fait un passage d'un an mais tu as trouvé une autre voie qui te réussit bien je te souhaite le meilleur ! Who run the world ? Girls !! J'ai une pensée également pour Latifa, Jessica, Stéphanie, Delphine et Salim

Merci à Sébastien, Lydia, Anne et Ludivine pour tous les échanges scientifiques et pour votre bonne humeur. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous ! Merci à Jérôme Kluza et Philippe Marchetti pour les échanges au cours de notre collaboration.

Merci à Bruno Malet pour sa précieuse aide, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi ! merci à Diogo et Sofia, mes voisins de bureau des mines pour la bonne ambiance dans le bureau ! merci à tous les doctorants de SAGE (Tristan, Saliou, Thérèse, Malak, Alexandre, Hichem) pour les moments de pause café-thé-cacahuètes. Merci à tous les membres du département SAGE pour les échanges et la convivialité lors des repas du midi et lors des activités comme le karting, je pense particulièrement à Nadine, Esperanza, Véronique, Frédéric, Marie, François, Thierry, Vincent, Aude, Sabine, Jean-Luc, Alexandre.

Je tiens à remercier Véronique Fafeur qui fut la première à me faire confiance et qui m'a appris la rigueur scientifique à la Véro et surtout à rendre un mémoire de Master parfait après au moins 30 versions corrigées. Je remercie Oleg Melnyk pour son accueil au sein du laboratoire et pour m'avoir fait confiance. J'ai une pensée très particulière pour mon mentor, Jérôme Vicogne, qui a su me donner la passion de la recherche et qui m'a tout appris ! Comment oublier tes discussions à la Fred et Jamy avec Gautier ou encore le punch de Noel ou la beauté chimérique... Et surtout ton amour pour la viennetta! merci à Arnaud Le Goff qui a été plus

qu'un collègue et m'a appris toutes les techniques et tous les trucs et astuces d'un bon chercheur, je suis heureuse de t'avoir rencontré et de te compter parmi mes amis ! merci à Gautier Goormachtich pour nos conversations et tous les bons conseils que tu m'as apportés, merci pour les fous rires surtout continue à chercher la bagarre ! merci à ma petite Alex qui m'a tant aidée et tant apportée ! Un grand merci à Eric et Roland pour l'aide et pour vos petites blagues ! Sans oublier Claire que je remercie pour avoir continué et finalisé mes travaux qui nous ont permis d'avoir un beau co-premier auteur. Sans oublier mon super chimiste, Laurent, qui mieux que Kent gère la chimie de ligation !!! Do you know Ermanno !? Merci à Hervé, Manue, Nathalie, Annick, Rémi et JP !

Je tiens à remercier ma famille avec qui je suis si proche et qui m'aide et me soutient quotidiennement. Je tiens à n'oublier personne !

J'ai d'abord une pensée très émue pour mon cousin Victor qui nous a quittés trop vite, tu étais comme mon frère et tu laisses un vide énorme dans mon cœur. J'ai également une pensée émue pour ma tata Cécile qui nous a également quittés et que j'adorais tant !

Merci à mes cousins Guillaume et Gauthier qui sont comme mes frères et à mon oncle Hugo

Merci à mes beaux parents Gérard et Pandora ainsi qu'à mes beaux frères, belles sœurs et nièce : Tyrone, Brooke, Mehdi, Fanny et Amy

Merci à mes grands-parents, Francine et Marcel, qui m'ont élevée comme leur propre fille et qui font toujours tout pour moi ! Papy tu nous as quitté il y a quelques jours, tu as vu mon manuscrit en photo et tu étais fier ! Ta présence va manquer à ma soutenance !

Merci à mon parrain Christophe pour ta présence

Merci à mon Papa et ma belle mère Valérie ainsi qu'à mes petites sœurs Maud et Manon d'être toujours à mes côtés

Merci à Mon frère Aurélien, à ma belle sœur Delphine, mon neveu Ludwig et ma nièce Victoria pour tout l'amour que vous m'apportez !

Merci à mon beau père Éric de m'avoir en partie élevée et merci d'être toi !

Merci à ma Maman pour tout ! tu as toujours été à mes côtés pour me pousser toujours vers le haut et me soutenir ! tu nous as donné ta vie et ton amour !

Merci à ma moitié, Wilde, celui qui est dans ma vie depuis bientôt 11 ans, celui qui me comprend et qui a toujours été là pour moi et celui qui me donne tout son amour et qui m'a fait le plus beau cadeau du monde.

Enfin je dédie ce manuscrit à ma fille Charlène, tu es née à la fin de ma thèse après une grossesse un peu compliquée mais tu m'as donné et tu me donnes la force de soulever des montagnes et même si ce n'était pas évident de finir mon manuscrit tout en t'accordant le plus de temps possible, j'y suis arrivée et c'est grâce à toi ! maman t'aime très fort !

## Valorisations Scientifiques

### Communications orales :

**Pollution atmosphérique particulaire et cancérogenèse pulmonaire : Relation entre caractéristiques physicochimiques et mécanismes toxicologiques dans des modèles in vivo et in vitro innovants.**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Jean-Marc Lo-Guidice, Laurent Alleman, Patrice Coddeville et Guillaume Garçon. Journée des doctorants en cancérologie, à Lille, le 11 Juin 2014.

**Pollution atmosphérique particulaire et cancérogenèse pulmonaire : Relation entre caractéristiques physicochimiques et mécanismes toxicologiques.**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Jean-Marc Lo-Guidice, Laurent Alleman, Patrice Coddeville et Guillaume Garçon. Journée des doctorants PC2A – Mines Douai, à Lille, le 10 Juin 2014. (1er prix Oral).

**Développement d'un protocole d'expositions réitérées à l'interface air/liquide de cellules épithéliales bronchiques humaines, saines ou pathologiques, à des polluants atmosphériques particulaires (PM<sub>2.5</sub>).**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Sébastien Anthérieu, Jean-Marc Lo-Guidice et Guillaume Garçon. Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air à Lille, les 10-11 Février 2014.

### Communications posters :

**Trace elements bioaccessibility in fine particles from the urban area of Lille (France).**

Bérénice Leclercq, Laurent Alleman, Guillaume Garçon et Patrice Coddeville. 22th European Aerosol Conference, à Tours, du 4 au 9 septembre 2016.

**Usefulness of normal or diseased human bronchial epithelial cell models differentiated at air-liquid interface to study the effects of air pollution-derived PM<sub>4</sub>.**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Sébastien Anthérieu, Laurent Alleman, Esperanza Perdrix, Jean-Marc Lo Guidice, Patrice Coddeville, Guillaume Garçon. 22th European Aerosol Conference, à Tours, du 4 au 9 septembre 2016.

**Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelial cells at air-liquid interface to study the effects of air pollution-derived fine PM.**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Sébastien Anthérieu, Laurent Alleman, Esperanza Perdrix, Jean-Marc Lo Guidice, Patrice Coddeville, Guillaume Garçon. Air-Liquid Interface Workshop, à Paris, le 21mars 2016.

**Pollution atmosphérique particulaire et cancérogenèse pulmonaire.**

Bérénice Leclercq, Mélanie Happillon, Bruno Malet, Jean-Marc Lo-Guidice, Laurent Alleman, Guillaume Garçon et Patrice Coddeville. Journée Climibio, à Lille, le 8 janvier 2015.



## Abréviations

3'UTR	3' Untranslated Transcribed Region
8-OHdG	8-Hydroxy-2'-désoxyGuanosine
AH	Automne-Hiver
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AIS	Aérosols Inorganiques Secondaires
AKR1C1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C1
ALF	Artificial Lysosomal Fluid
AOS	Aérosols Organiques Secondaires
Apaf	Apoptotic protease activating factor
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine TriPhosphate
ATR	ataxia telangiectasia
AVIESAN	Alliance pour les sciences de la VIE et de la SANTé.
B(a)P	Benzo(a)pyrène
B-ALI	Air-Liquid Interface medium
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma XL
BEGM	Bronchial Epithelial BulletKit
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
Bik	BCL2 interacting killer
BPCO	Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstructives
BPE	Bovine Pituitary Extract
CBP	Cancers Broncho-Pulmonaires
CDK	Cyclin-Dependent Kinases
CEBH	Cellules Epithéliales Bronchiques Humaines
CFHA	Commission Fédérale de l'Hygiène de l'Air
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CNPC	Carcinomes Non à Petites Cellules
COV	Composés Organiques Volatils
CRP	C-Reactive Protein
CVF	Capacité Vitale Forcée
CYP1A1	Cytochromes p450 1a1
Dae	Diamètre Aérodynamique
DEP	Débit Expiratoire de Pointe
DNMT	DNA Methyltransferase
DPPE	DiPalmitoylPhosphatidylCholine
DTT	DiThioThreitol
EC	European Commission
EC	Elementary Carbon
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EEA	European Environment Agency



EEC	European Economic Community
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular signal–regulated kinases
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FADH2	Dihydroxy Flavine Adénine Dinucléotide
G1	Gap 1
G2	Gap 2
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GC-MS/ MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry- Mass Spectrometry-
GM-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GSH	Glutathion
GSSG	Disulfure de Glutathion
GST	Glutathione S-Transferase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HAT	Histone Acetyltransferase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histone Desacetylase
HPLC-EC	High pressure liquid chromatography/Electrochemical detection
IAL	Interface Air Liquide
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL-1 $\beta$	InterLeukines 1 $\beta$
IL-6	InterLeukines 6
IL-8	InterLeukines 8
INCa	Institut National Du Cancer
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
LINE-1	Long INterspersed Elements
LPS	LipoPolySaccharide
M	Mitose
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDA	Malondialdéhyde
MDA-TBA	Malondialdéhyde-thiobarbituric acid
MDM2	Murine Double Minute 2
miRNAs	micro-ARNs
MO	Matière Organique
MUC5AC	Mucin 5AC
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-kB	Nuclear Factor-Kappa B
NHBE	Normal Human Bronchial Epithelial Cells
NIST	National Institute of Standards and Technology
NRAS	Neuroblastoma RAS
NRF2	NucleaR Factor (erythroid-derived 2)-like 2
OC	Organic Carbon
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques

OH	Radical Hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PARTICLES	Particulate Matter lung cancer effects
PBDE	PolyBromoDiphénylEthers
PBodies	Processing Bodies
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	PolyChloroBiphényles
PCDDs	PolyChloroDibenzo-p-Dioxines
PE	Printemps-Eté
PFA	ParaFormAldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PM	Particulate Matter
PTFE	Polytétrafluoroéthène
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3
QC	Quality Control
Rb	Retinoblastome
RISC	RNA Induced Silencing Complex
ROS	Reactive Oxygene Species
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SAM	S-Adenosyl Methionine
SERPINB2	Serpin Family B Member 2
SLC30A1	Solute Carrier Family 30 Member 1
SOD	SuperOxyde Dismutase
SP	Surfactant protein
SRM2786	Standard Reference Material 2786
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TCDD	Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TGF $\alpha$ ou $\beta$	Transforming Growth Factor
TNF $\alpha$ ou $\beta$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ou $\beta$
TRAIL	Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSP	Total Suspended Particles
USEPA	United States Environmental Protection Agency
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
WHO	World Health Organisation
XAP2	X-Associated protéine 2
XO	Xanthine Oxydase
XRE	Xenobiotique Response Element



## SOMMAIRE

<b>CHAPITRE I INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>1. Pollution de l'air et effets sur la santé.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 Définition de la pollution. ....</b>	<b>25</b>
<b>1.2 Historique.....</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Effet de la pollution de l'air sur la santé. ....</b>	<b>28</b>
<b>2. Composition particulaire et bioaccessibilité des métaux particulaires.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Sources et composition de la pollution particulaire. ....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Taille des particules .....	30
2.1.2 Sources primaires.....	31
2.1.2.1 Sources naturelles.....	31
2.1.2.2 Sources anthropiques.....	32
2.1.3 Particules secondaires. ....	33
2.1.4 Transport et dépôt des particules dans l'atmosphère .....	34
2.1.5 Composition particulaire.....	36
2.1.6 Caractérisation chimique des PM <sub>10</sub> et PM <sub>2.5</sub> .....	38
<b>2.2 Composition et sources des métaux associés aux PM<sub>2.5</sub> urbaines. ....</b>	<b>41</b>
2.2.1 Généralités sur les sources d'émissions des métaux.....	41
2.2.2 Métaux traceurs urbains.....	42
2.2.2.1 Métaux issus du trafic routier.....	42
2.2.2.2 Métaux issus de l'activité tertiaire en zone urbaine. ....	44
<b>2.3 Bioaccessibilité des métaux adsorbés aux PM. ....</b>	<b>44</b>
2.3.1 Définition de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité. ....	44
2.3.2 Bioaccessibilité pulmonaire des métaux.....	46
2.3.2.1 Structure du poumon et de l'épithélium bronchique.....	46
2.3.2.2 Pénétrance, déposition et mécanismes de clairance pulmonaire.....	47
2.3.2.3 Objectifs de la bioaccessibilité pulmonaire des métaux.....	49
2.3.3 Bioaccessibilité des métaux adsorbés aux PM.....	50
2.3.3.1 Bioaccessibilité des métaux dans l'eau. ....	50
2.3.3.2 Bioaccessibilité des métaux dans des tampons phosphate. ....	51
2.3.3.3 Bioaccessibilité des métaux dans le surfactant alvéolaire.....	51
2.3.3.4 Bioaccessibilité des métaux dans le mucus.....	55
2.3.3.5 Paramètres influençant la bioaccessibilité des métaux .....	56
2.3.4 Conclusion sur la bioaccessibilité des différents métaux. ....	57
<b>3. PM, effets sur la santé et mécanismes d'action toxique. ....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Réglementations européennes et américaines.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Etudes épidémiologiques sur l'impact des PM. ....</b>	<b>60</b>
3.2.1 Exposition aux PM et mortalité .....	60
3.2.2 Exposition aux PM et morbidité .....	61
3.2.2.1 Exposition aux PM et risques cardiovasculaires. ....	61
3.2.2.2 Exposition aux PM <sub>2.5</sub> et risques pulmonaires. ....	63
3.2.2.3 Exposition aux PM <sub>2.5</sub> et cancers. ....	65
<b>3.3 Toxicologie des particules fines.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Différents modèles cellulaires et méthodologies utilisés pour la toxicologie des PM <sub>2.5</sub> . ....	67
3.3.1.1 Etudes humaines en milieu contrôlé.....	67
3.3.1.2 Modèles in vivo.....	68
3.3.1.3 Modèles in vitro .....	69
3.3.2 Principaux mécanismes décrits dans la toxicologie des PM.....	72

3.3.2.1	L'inflammation.....	72
3.3.2.2	Le stress oxydatif. ....	75
3.3.2.3	Rôle des mitochondries dans la respiration cellulaire et le stress oxydatif.....	77
3.3.2.4	Implication des PM <sub>2.5</sub> dans le stress oxydatif et la respiration cellulaire.....	78
3.3.2.5	PM <sub>2.5</sub> et génotoxicité .....	80
3.3.2.6	PM <sub>2.5</sub> et métabolisme .....	81
3.3.2.7	PM <sub>2.5</sub> , cycle cellulaire, dommages à l'ADN et apoptose .....	82
3.3.2.7.1	Cycle cellulaire et dommages à l'ADN.....	82
3.3.2.7.2	Mort cellulaire .....	84
3.3.2.7.3	Effets des PM <sub>2.5</sub> sur le cycle cellulaire et la mort cellulaire.....	86
3.3.2.8	PM <sub>2.5</sub> et épigénétique .....	87
3.3.2.8.1	Généralités sur les mécanismes épigénétiques.....	87
3.3.2.8.2	Mécanismes impliqués dans la méthylation de l'ADN et sa régulation.....	88
3.3.2.8.3	Méthylation de l'ADN et effets des PM.....	90
3.3.2.8.4	Mécanismes impliqués dans la modification des histones. ....	91
3.3.2.8.5	Modifications des histones et polluants atmosphériques. ....	93
3.3.2.8.6	Implication des micro-ARN dans la régulation post-transcriptionnelle.....	94
3.3.2.8.7	miARNs et effets des PM.....	96
3.3.2.8.8	PM <sub>2.5</sub> et autres mécanismes cellulaires .....	97
<b>3.4</b>	<b>Cancérogénèse pulmonaire et pollution particulaire.....</b>	<b>99</b>
3.4.1	Carcinogénèse et anatomopathologie des cancers bronchopulmonaires .....	99
3.4.2	Quelques altérations génétiques fréquemment retrouvées dans les CBP. ....	100
3.4.3	Quelques altérations épigénétiques fréquemment rencontrées dans les CBP...101	
3.4.4	Pollution atmosphérique, cancérogène avéré pour l'homme : composés classés cancérogènes avérés. ....	103
3.4.5	Pollution particulaire et cancérogénèse pulmonaire. ....	105
<b>4.</b>	<b>Problématique de thèse .....</b>	<b>106</b>
 <b>CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES.....</b>		<b>109</b>
<b>1.</b>	<b>Site et méthodologie de prélèvements .....</b>	<b>111</b>
<b>2.</b>	<b>Systèmes de collection des PM<sub>2.5</sub>.....</b>	<b>111</b>
<b>3.</b>	<b>Principe de l'ICP-MS .....</b>	<b>113</b>
<b>4.</b>	<b>Caractérisation chimique des PM<sub>2.5</sub>.....</b>	<b>114</b>
<b>5.</b>	<b>Bioaccessibilité .....</b>	<b>115</b>
 <b>CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>		<b>119</b>
<b>1.</b>	<b>Article 1 : Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution derived PM<sub>4</sub> .....</b>	<b>121</b>
<b>2.</b>	<b>Article 2 : Genetic and epigenetic alterations in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution- derived PM<sub>2.5</sub> .....</b>	<b>153</b>
<b>3.</b>	<b>Article 3 : Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: toxicological perspectives.....</b>	<b>185</b>

<b>4. Article 4 : Mitochondrial disorders in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM2.5 .....</b>	<b>213</b>
<b>CHAPITRE IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES. ....</b>	<b>231</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>247</b>



## Liste des figures

### CHAPITRE I INTRODUCTION

<b>Fig.1 : Photo du grand smog de Londres, prise à Piccadilly Circus le 5 décembre par HULTON GETTY. ....</b>	<b>27</b>
<b>Fig.2 : Emissions des PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> et des gaz précurseurs des PM secondaires tels que NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, NH<sub>3</sub> et COV en Europe (EEA., 2013). ....</b>	<b>27</b>
<b>Fig.3 : Impacts de la pollution atmosphérique sur la santé humaine. Les impacts sont nombreux et peuvent affecter de nombreux organes (EEA, 2013). ....</b>	<b>29</b>
<b>Fig.4. Principales sources d'émission des PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> et PM<sub>1.0</sub>, en 2011, en France métropolitaine d'après CITEPA / FORMAT SECTEN – Avril 2013.....</b>	<b>33</b>
<b>Fig.5. Distribution de la taille des particules présentes dans l'atmosphère selon quatre modes : nucléation, Aitken, accumulation et grossier. ....</b>	<b>36</b>
<b>Fig.6 : Mesure de la composition chimique moyenne des PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> issues de zones rurales, urbaines ou trafics, mesurées dans plusieurs agglomérations Européennes. D'après Putaud et al., (2004).....</b>	<b>39</b>
<b>Fig.7 : Mesure de la composition chimique moyenne des PM<sub>2.5</sub> issues de zones rurales, urbaines ou trafics, mesurées dans l'agglomération Parisienne. D'après Airparif., 2011. ....</b>	<b>40</b>
<b>Fig.8 : Concentration des métaux classés cancérigènes dans les particules diesel ou essence. Pulles et al., 2012.....</b>	<b>43</b>
<b>Fig.9 : Tableau récapitulatif des principaux éléments émis par des sources urbaines.....</b>	<b>44</b>
<b>Fig.10 : Appareil respiratoire. Schéma des voies aériennes supérieures composées du pharynx et Larynx et des voies aériennes inférieures composées des bronches, bronchioles et alvéoles pulmonaires.....</b>	<b>46</b>
<b>Fig.11 : Schéma de l'épithélium bronchique composé de cellules caliciformes à mucus, de cellules basales et de cellules ciliées reposant sur un tissu conjonctif et de l'épithélium alvéolaire composé des pneumocytes 1 et 2 avec la présence de macrophages alvéolaires. ....</b>	<b>47</b>
<b>Fig.12 : Appareil respiratoire. Pénétrance pulmonaire, dépôt et principaux mécanismes d'élimination des PM.....</b>	<b>49</b>
<b>Fig.13 : Composition du matériel tensioactif du surfactant pulmonaire.....</b>	<b>53</b>
<b>Fig.14 : Composition des dérivés de la solution Gamble (Boisa et al., 2014).....</b>	<b>54</b>
<b>Fig.15 : Liste des principaux surfactants commerciaux utilisés en clinique. ....</b>	<b>55</b>
<b>Fig.16 : Composition chimique du mucus pulmonaire pour 100g de matière et composition ionique du mucus pulmonaire chez les sujets sains en mEq/g.....</b>	<b>56</b>
<b>Fig.17 : Tableau récapitulatif des valeurs limites et du nombre de dépassements autorisés par an pour les PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> en Europe et aux Etats Unis. ....</b>	<b>59</b>
<b>Fig.18 : Schéma de la culture des CEBH à l'interface air liquide (IAL). ....</b>	<b>71</b>
<b>Fig.19 : L'exposition aux particules favorise l'inflammation. ....</b>	<b>74</b>
<b>Fig.20 : Formation des espèces réactives de l'oxygène. ....</b>	<b>76</b>



<b>Fig.21 : Les cellules normales vont convertir le glucose en pyruvate dans le cytosol par la glycolyse. ....</b>	<b>78</b>
<b>Fig.22 : Voie d'activation de l'AHR. ....</b>	<b>82</b>
<b>Fig.23 : Cycle cellulaire et dommages à l'ADN : rôle de la protéine p53. ....</b>	<b>83</b>
<b>Fig.24 : Mécanismes conduisant à l'apoptose.....</b>	<b>85</b>
<b>Fig.25 : Illustration des trois modifications épigénétiques les plus importantes. ....</b>	<b>88</b>
<b>Fig.26 : Méthylation de l'ADN.....</b>	<b>89</b>
<b>Fig.27 : L'exposition aux PM induit des modifications de méthylation de l'ADN. ....</b>	<b>91</b>
<b>Fig.28 : Nucléosome et modifications des histones.....</b>	<b>92</b>
<b>Fig.29 : Tableau récapitulatif qui reprend les effets des PM, des métaux et HAP sur les modifications des histones avec des exemples de gènes cibles.....</b>	<b>94</b>
<b>Fig.30 : Synthèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible.....</b>	<b>95</b>
<b>Fig.31 : Tableau récapitulatif qui reprend les effets des PM, des métaux et HAP sur les modifications de l'expression de certains miARN avec des exemples de processus cellulaires ciblés.....</b>	<b>97</b>
<b>Fig.32 : Principaux mécanismes impliqués dans la cancérogenèse. D'après Hanahan and Weinberg., 2011.....</b>	<b>100</b>

## **CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES**

<b>Fig.33 : Lieu du site de prélèvement d'après Google Maps .....</b>	<b>111</b>
<b>Fig.34 : Schéma du système de prélèvement par filtration .....</b>	<b>112</b>
<b>Fig.35 : Schéma du principe d'impaction en cascade (Renoux et Boulaud, 1998). ....</b>	<b>113</b>
<b>Fig.36 : Schéma de l'interface et du système de mesure IC-PMS .....</b>	<b>114</b>

## **Contexte scientifique**



La pollution atmosphérique, pourtant sensiblement réduite depuis quelques décennies dans les pays développés, continue à exercer des effets néfastes sur la santé. En effet, l'exposition aux polluants environnementaux reste une source majeure de risque pour la santé dans le monde. D'après un article publié dans *Lancet*, en 2012, les PM (*Particulate Matter*) ambiantes sont responsables de 3,2 millions de morts par an et de 76 millions d'années de vie en bonne santé perdues. De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une exposition à des concentrations faibles ou modérées de polluants peut avoir des conséquences sur la santé à court et à long terme. A l'heure actuelle, de par l'action des politiques environnementales sur la réduction des émissions polluantes, les épisodes d'intoxications sévères sont de moins en moins observés. Cependant, les expositions chroniques sont davantage problématiques et peuvent être liées à une morbidité, voire une mortalité associée à de graves atteintes pulmonaires et cardiaques ou des cancers. En effet, une récente méta-analyse de Pope et de ses collaborateurs en 2011, a montré une relation de causalité entre l'exposition aux niveaux usuels de la pollution atmosphérique et la mortalité par causes cardio-respiratoires, et notamment par Cancers Broncho-Pulmonaires (CBP).

Bien que le tabagisme demeure le principal facteur de risque des CBP, la pollution atmosphérique semble également être impliquée dans le développement de ces cancers. Les résultats de nombreuses études épidémiologiques et d'études *in vitro* et *in vivo* ont permis de s'assurer de la réelle implication de la pollution atmosphérique dans la cancérogenèse. C'est à la suite de ces observations que très récemment (2013), la pollution atmosphérique, notamment particulaire, a été classée comme cancérogène avéré pour l'Homme (CIRC groupe 1). Parmi les polluants atmosphériques, les particules fines ( $PM_{2.5}$  : *Particulate matter* <  $2.5 \mu m$ ) constituent l'un des principaux facteurs de risque sanitaire lié à la pollution de l'air. Des études épidémiologiques ont montré une forte corrélation entre la mortalité et l'exposition aux  $PM_{10}$  ou  $PM_{2.5}$ , cette mortalité faisant également suite à des bronchopathies, cardiopathies ou cancers. En effet, le nombre de décès, par cancer du poumon, imputables à l'exposition aux  $PM_{2.5}$  représente environ 11% de l'ensemble des cas de cancer du poumon. Suite à ces différentes observations, l'étude des effets des PM sur la santé a été classée prioritaire du fait de leur abondance, de leur complexité et surtout du manque de connaissances sur les mécanismes conduisant aux pathologies observées.

**L'objectif de mon projet de thèse est d'évaluer le rôle des PM<sub>2,5</sub>, prélevées sur un site urbain (Lille), dans la cancérogenèse pulmonaire et ce, par une approche pluridisciplinaire qui contribuera à établir une relation entre la physico-chimie et la toxicologie de ces particules.**

Les PM<sub>2,5</sub> présentent une complexité physico-chimique (taille, nombre, morphologie et composition chimique des particules) et une grande variabilité temporelle. En effet, ces particules sont constituées de nombreux polluants toxiques organiques, notamment des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) ou encore des métaux et ce à des teneurs parfois importantes. La complexité de leur composition rend les données toxicologiques difficilement interprétables, d'autant plus que la majorité des études toxicologiques publiées jusqu'à récemment ont souvent sous-estimé la partie physico-chimique. Beaucoup d'efforts ont actuellement été consentis pour discerner les caractéristiques physico-chimiques et les effets sur la santé humaine des particules atmosphériques. Cependant ces efforts restent insuffisants puisqu'aucun consensus n'a été trouvé quant à l'implication des différents constituants des PM dans leur toxicité et notamment dans la cancérogénèse pulmonaire. Par conséquent, de nouvelles études regroupant à la fois des analyses physico-chimiques fines et des études toxicologiques *in vitro* et *in vivo* s'avèrent indispensables à la meilleure compréhension des mécanismes toxicologiques par lesquels les particules fines vont contribuer au développement de cancers pulmonaires.

Ma thèse est adossée au projet Particles (Particulate matter lung cancer effects) financé dans le cadre de l'Appel A Propositions (AAP) de recherche en "Cancer et Environnement", proposé par l'ITMO Cancer de l'AVIESAN, en collaboration avec l'INCa et l'INSERM. Ce projet cherche à apporter des informations novatrices et pertinentes sur le rôle possible de la pollution atmosphérique particulaire (PM<sub>2,5</sub>), prélevée en milieu urbain, à deux saisons contrastées, dans la cancérogénèse pulmonaire, en utilisant des approches toxicologiques *in vitro* et *in vivo* innovantes.

La première partie de mon projet a été consacrée aux prélèvements des PM<sub>2,5</sub>, à Lille, au cours de deux saisons contrastées, et à l'évaluation de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ces dernières comprennent leur granulométrie, leur composition chimique (métaux et HAP) ou encore leur bioaccessibilité à la fois dans des milieux de culture cellulaire ou des fluides bronchiques. Sur la base de données de compositions chimiques journalières, nous avons pu

identifier à partir d'un modèle de type sources-récepteur, les principales sources de pollution ayant impacté le site de prélèvements aux cours des deux saisons.

La seconde partie de mon projet a été consacrée aux analyses toxicologiques. Des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) issues de sujets sains et de patients atteints de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) ont été utilisées pour la partie *in vitro* du projet. Des cellules de patients BPCO ont été choisies afin d'intégrer une sensibilité préexistante et représentative de la population exposée quotidiennement aux polluants particulaires. Dans les cellules des patients BPCO, qui présentent une inflammation chronique, nous souhaitons évaluer le potentiel que pourrait avoir ces cellules à exacerber ou modifier la réponse cellulaire initiée par les particules inhalées. Les CEBH ont été exposées ou non à l'interface air liquide, de manière réitérée, à des PM<sub>2,5</sub> (2,5 ou 10 µg/cm<sup>2</sup>). Dans un premier temps, une analyse pangénomique a été réalisée à la fois par l'utilisation de puces à ADN et de puces à micro-ARN. Les puces à ADN ont permis de détecter des modifications d'expression de certains gènes, potentiellement induites par les PM<sub>2,5</sub>, et ce parmi des milliers de gènes candidats. Les puces à micro-ARN ont mesuré des modifications d'expression de certains micro-ARN qui sont de petits ARN impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle, étant notamment capables d'induire l'extinction de l'expression d'un gène. En parallèle, une analyse ciblée a été réalisée sur certaines voies qui sont couramment retrouvées dérégulées dans les CBP. Parmi ces voies, nous nous sommes intéressés au potentiel réplicatif, à certains facteurs épigénétiques, à l'inflammation et au stress oxydatif des cellules traitées ou non aux PM<sub>2,5</sub>.



**CHAPITRE I**

**INTRODUCTION**





## 1. Pollution de l'air et effets sur la santé.

### 1.1 Définition de la pollution.

D'après le dictionnaire Larousse, la définition de la pollution est la suivante : *Dégradation de l'environnement par des substances (naturelles, chimiques ou radioactives), des déchets (ménagers ou industriels) ou des nuisances diverses (sonores, lumineuses, thermiques, biologiques, etc.). [Bien qu'elle puisse avoir une origine entièrement naturelle (éruption volcanique, par exemple), elle est principalement liée aux activités humaines.].* Cette définition n'est pas tout à fait complète car elle n'évoque pas les atteintes de la pollution sur la santé humaine.

L'agence européenne de l'environnement définit donc la pollution, dans le cas de la pollution de l'air de manière plus précise et prend en compte les atteintes sur la santé humaine : *La pollution de l'air comprend l'existence de certains polluants dans l'atmosphère à des niveaux suffisants pour affecter la santé humaine, l'environnement et le patrimoine culturel.*

### 1.2 Historique.

Historiquement, de nombreuses catastrophes telles que le grand *smog* de Londres, en 1952, ont montré l'effet direct de la pollution environnementale sur la santé. Dans les années 50, les épais brouillards de fumée nommés *smog* (contraction des mots *smoke* et *fog*) étaient courants (Fig.1). Cependant le *smog* du 4 décembre 1952, fut particulièrement meurtrier pour plusieurs raisons : la météo particulièrement froide avec un vent peu présent et un taux d'humidité important ont favorisé l'accumulation des polluants et l'utilisation du chauffage domestique avec une combustion importante de bois et de charbon. Ces conditions particulières en plus de l'activité industrielle intensive ont contribué, à l'époque, à l'émission importante de gaz polluants tels que les oxydes de soufre (SO<sub>x</sub>), des oxydes de carbone (CO<sub>x</sub>) et à la production de particules (PM). Des expositions à des concentrations importantes de ces polluants ont entraîné plus de 12.000 décès suite à des bronchopathies telles que des broncho-pneumonies ou des bronchites purulentes aiguës ou encore des pathologies cardiaques telles que des infarctus du myocarde (Hunt et al., 2003 ; Fenger., 2009). Cet épisode meurtrier ainsi que bien d'autres (le *smog* de la vallée de la Meuse), ont contribué à une réelle prise de conscience des autorités quant à la dangerosité de ces polluants sur la santé publique.

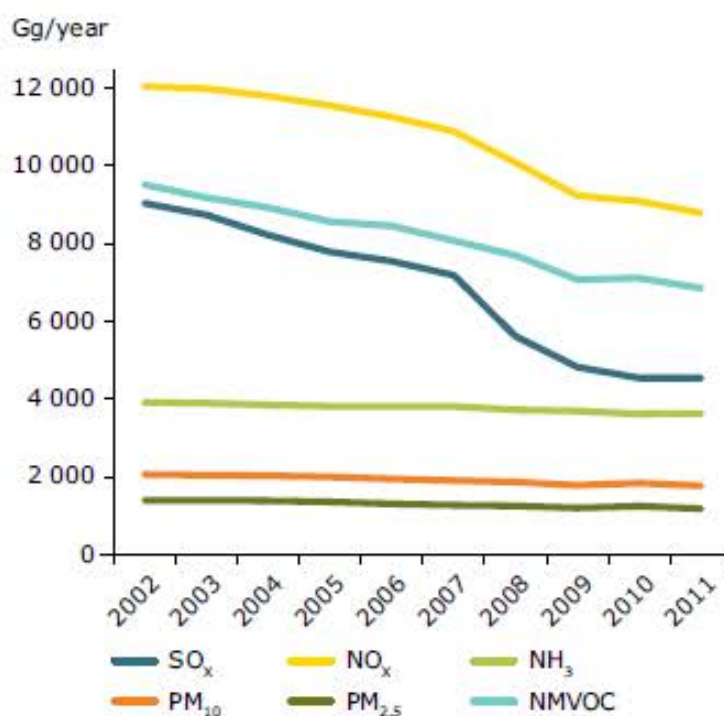
Par la suite, une série de lois est entrée en vigueur dans le but d'empêcher qu'une telle situation ne se reproduise, notamment le *Clean Air Act* de 1956 en Angleterre qui avait pour objectif de réduire la pollution de l'air en interdisant la production de fumées noires. Puis, le *Clean Air Act* de 1963 aux États-Unis et, en France, la loi du 2 août 1961 relative à la lutte contre les pollutions atmosphériques et les odeurs, avaient pour objectif d'éviter les pollutions de l'atmosphère qui incommode la population et compromettent la santé ou la sécurité publique. Jusque dans les années 70, les émissions de SO<sub>x</sub> ont continué à augmenter de même que les émissions polluantes dans les zones urbaines et depuis cette date, les émissions polluantes ont concrètement commencé à diminuer. De nombreuses directives européennes se sont succédées et ont permis de réglementer les émissions de polluants. La première directive Européenne sur la qualité de l'air fut adoptée en 1980 (EEC, 1980) et a permis de fixer des valeurs de concentrations, notamment pour le SO<sub>2</sub> et les particules à ne pas dépasser pour protéger l'environnement et la santé humaine. Actuellement les réglementations européennes se basent sur la directive 2008/50/CE.

La pollution atmosphérique a des origines naturelles mais est surtout inhérente à l'activité humaine, notamment à la production industrielle, l'agriculture, les activités domestiques ou encore les transports. En France, 11 millions de tonnes de polluants sont émis dans l'atmosphère chaque année (ADEME). Parmi les principaux polluants, sont retrouvés l'ozone (O<sub>3</sub>), les oxydes de soufre, d'azote ou de carbone (SO<sub>x</sub>, NO<sub>x</sub> et CO<sub>x</sub>), les métaux, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les composés organiques volatils (COV) et les particules (PM). Les réglementations sur la qualité de l'air ont permis de diminuer de manière très importante les rejets dans l'air d'un grand nombre de polluants tels que les SO<sub>x</sub>, les COV, les métaux lourds et également les PM de fraction grossière. Depuis les années 1980, l'émission des gaz toxiques a fortement diminué avec une baisse de 85% des émissions de SO<sub>2</sub> (Fenger., 2009), de 39% de celles des NO<sub>x</sub> et celle des particules totales d'environ 8% (ADEME). Cependant, là où la diminution de l'émission des gaz toxiques est importante, elle reste faible pour les PM de fraction fine, ceci étant lié à l'accroissement du nombre de véhicules sur les routes, notamment de véhicules diesel (ADEME., 2012). En effet, l'émission des PM<sub>10</sub>

et  $PM_{2.5}$  est mesurée, en Europe, depuis 2000 et depuis cette date, des faibles diminutions de 9% et 16% ont été relevées pour les  $PM_{10}$  et  $PM_{2.5}$ , respectivement (Fig.2).



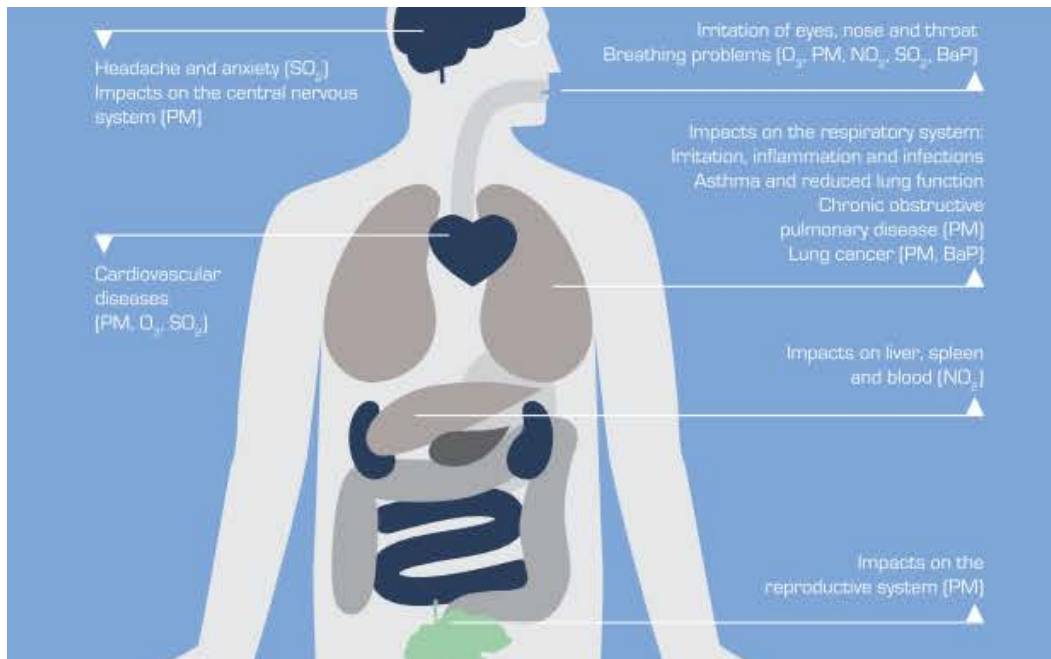
**Fig.1** : Photo du grand smog de Londres, prise à Piccadilly Circus le 5 décembre par HULTON GETTY.



**Fig.2** : Emissions des  $PM_{10}$  et  $PM_{2.5}$  et des gaz précurseurs des PM secondaires tels que  $NO_x$ ,  $SO_x$ ,  $NH_3$  et  $COV$  en Europe (EEA., 2013).

### 1.3 Effet de la pollution de l'air sur la santé.

Des études épidémiologiques montrent que des expositions aux polluants atmosphériques peuvent entraîner des effets à court et à long terme sur la santé et ce dépendamment des concentrations de polluants présents. En 2013, 5,5 millions de morts sont associés à la pollution de l'air dans le monde et les estimations évaluent entre 6 et 9 millions de morts d'ici à 2060 (OCDE., 2016). De plus, les efforts menés par les politiques environnementales sur la réduction des émissions polluantes ont permis de réduire les épisodes d'intoxications sévères, notamment dans les pays développés. Par conséquent, les effets liés à des expositions chroniques aux polluants atmosphériques sont plus importants que ceux liés à des expositions à court terme et sont clairement associés à une morbidité voire une mortalité par de graves atteintes pulmonaires, cardiaques ou des cancers. Parmi les pathologies associées, sont retrouvées des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), l'asthme, des cancers du poumon, des infarctus du myocarde ou bien d'autres impacts notamment sur le système nerveux central (Fig.3) (EEA, 2013). En effet, le SO<sub>2</sub> et l'O<sub>3</sub> participent à la pathogenèse cardiovasculaire et favorisent l'irritation des muqueuses aériennes supérieures. Les particules sont responsables de graves atteintes cardio-respiratoires, de cancers pulmonaires, d'irritations des muqueuses aériennes supérieures et d'atteintes du système nerveux notamment pour la fraction la plus fine. De plus, certaines personnes, du fait de facteurs de variabilité interindividuelle, qu'ils soient génétiques, épigénétiques ou encore physiologiques, sont plus sensibles à l'action de la pollution atmosphérique. En effet, les enfants, les personnes âgées ou les patients atteints d'asthme ou de BPCO sont particulièrement sensibles à cette pollution, notamment aux expositions aiguës. Cependant, ces effets néfastes apparaissent également à des concentrations de polluants bien inférieures et qui sont régulièrement mesurées dans les grandes villes européennes. En conclusion, la pollution atmosphérique est un mélange très complexe et hétérogène dont les PM représentent actuellement l'un des principaux facteurs de risque.



**Fig.3** : Impacts de la pollution atmosphérique sur la santé humaine. Les impacts sont nombreux et peuvent affecter de nombreux organes (EEA, 2013).

## 2. Composition particulaire et bioaccessibilité des métaux particuliers.

### 2.1 Sources et composition de la pollution particulaire.

Les particules sont des polluants complexes et hétérogènes, de composition chimique, de taille ou d'état variés qu'elles soient solides ou liquides. Les PM peuvent être directement émises par des sources naturelles (terrigènes, marines ou feux de forêts) ou anthropiques (chauffage résidentiel, transports ou industries), et seront dans ce cas qualifiées de particules primaires, ou être générées par des processus physico-chimiques complexes formant des particules dites secondaires. Les PM représentent un mélange de substances possédant des caractéristiques physico-chimiques très différentes (Horvath et al., 1996 ; Putaud et al., 2010). De plus, la composition physico-chimique des polluants atmosphériques particuliers peut également dépendre des sources et de l'intensité de leurs émissions, des conditions météorologiques, de la topographie locale et des interactions physico-chimiques qui existent entre les constituants physiques, chimiques et biologiques de ces aérosols (Buschini et al., 2001 ; Vecchi et al., 2004 ; Hand et al., 2012 ; Kundu et al., 2014). Ces différentes caractéristiques font des PM l'un des polluants les plus complexes de l'air dont la composition et les effets sur la santé restent encore mal compris. En effet, la composition précise de l'aérosol particulaire, notamment sa composition chimique, son évolution au cours du temps mais

également sa concentration dans l'air qui est extrêmement variable et reste difficile à appréhender. Par conséquent, la caractérisation chimique des particules est indispensable à l'évaluation de leur potentiel toxique chez l'homme. Cependant, la détermination de la composition chimique et des caractéristiques physiques des particules n'explique que partiellement leurs effets toxiques (Baulig et al., 2004).

### 2.1.1 Taille des particules

Les particules sont définies à la fois par la terminologie TSP (Total Suspended Particles) qui représente la fraction totale des particules atmosphériques ou par le terme PM qui permet de classer les particules en fonction de leur taille. Même si certaines particules semblent être de taille identique, leur forme et leur densité peuvent fortement varier ce qui, par conséquent, peut avoir une influence sur leur comportement à la fois dans l'atmosphère mais également dans les poumons suite à l'inhalation. Les particules peuvent être classifiées en fonction de leur diamètre équivalent qui correspond au diamètre que pourrait avoir une sphère possédant les mêmes propriétés physico-chimiques que la particule de taille irrégulière classiquement retrouvée dans l'aérosol particulaire. Le diamètre aérodynamique équivalent (D<sub>ae</sub>) apporte un degré supplémentaire de précision puisqu'il prend en compte la vitesse de sédimentation des particules, notamment lors de la déposition des particules le long du tractus respiratoire. Le D<sub>ae</sub> correspond au diamètre d'une particule sphérique avec une densité de 1 g/cm<sup>3</sup> qui a la même vitesse de sédimentation que la particule considérée. La notion de diamètre aérodynamique est généralement utilisée pour étudier la nature physique des particules et leur déposition dans les poumons ou dans l'environnement (Donaldson et al., 2002). Le D<sub>ae</sub> permet donc de classer les particules en trois groupes ; les PM<sub>10</sub> ou particules grossières, les PM<sub>2.5</sub> ou particules fines et les PM<sub>0.1</sub> ou particules ultrafines qui représentent la fraction comprenant des particules d'un D<sub>ae</sub> inférieur ou égal à 10 µm, 2,5 µm et 0,1 µm, respectivement.

### 2.1.2 Sources primaires.

De façon générale, les particules primaires sont issues en majorité de sources naturelles. En effet, les plus gros contributeurs de ces particules sont les mers et océans puisqu'ils représentent environ 75% de la surface de la terre (Lewis and Schwartz., 2004). Une autre source naturelle importante d'aérosol primaire est la poussière du sol qui est principalement issue de l'envol des résidus du sol par l'action du vent. Cette source est majoritaire dans les régions arides et désertiques (Mahowald et al., 2005). Les composés biologiques vont également fortement participer à l'émission des particules primaires, par la présence de pollens, de spores ou autres résidus végétaux et également de bactéries ou virus (Despres et al., 2012).

A l'échelle de la terre, les sources anthropiques participent en moindre mesure à l'émission des aérosols primaires bien que de manière très significative en milieu urbain. Les procédés industriels et de combustion sont les principales sources anthropiques de ces particules. La composition de ces particules est dominée par le carbone élémentaire et est riche en matière organique, notamment en hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bond et al., 2007).

#### 2.1.2.1 Sources naturelles.

Les particules peuvent être issues de sources naturelles, telles que des feux de forêts ou autre type de végétation, de cendres volcaniques, d'embruns marins, de l'érosion des sols ou de sources végétales ou animales sous forme de débris ou de micro-organismes (Fig.4).

Les incendies peuvent générer des panaches de fumée qui sont responsables d'effets sur la santé, notamment d'affections respiratoires (Nichol., 1998 ; Brunekreef and Holgate., 2002 ; Kunii., 2002). Les cendres volcaniques peuvent parcourir des kilomètres comme ce fut le cas lors de l'éruption de l'Eyjafjöll, volcan islandais, en 2010 (Picquout et al., 2013) Les Embruns marins produisent des particules fines de sel marin qui vont se former lorsque le vent souffle à la surface des océans. Les particules marines sont majoritairement composées de chlorure de sodium (NaCl) et également de traces de magnésium (Mg) et de sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Dans les régions côtières, les particules marines contribuent à 80% de la masse des PM<sub>10</sub> (Putaud et al., 2004). Les particules terrigènes sont issues de l'érosion des sols ou de l'envol de poussières du sol. Le vent va remobiliser les grosses particules qui vont sédimenter rapidement. En retombant, les grosses particules vont effectuer un mouvement dit de saltation c'est-à-dire



qu'elles vont faire une série de sauts sur le sol pour finalement redescendre. Ces mouvements vont entraîner la projection des fines particules dans l'air qui peuvent ensuite être transportées sur de longues distances. Les poussières sahariennes, par exemple, peuvent être retrouvées en Europe continentale (Guerzoni et al., 1997). Les micro-organismes participent également à cette pollution particulaire par l'émission de pollens, d'algues unicellulaires, de spores de champignons, de bactéries ou encore des débris de plantes ou d'insectes et cette fraction biologique peut également causer des effets sur la santé. (Miguel et al., 1999). En effet, les champignons filamenteux, type *Aspergillus*, se lient aux poussières du sol et favorisent la rétention d'eau du sol. Ces champignons peuvent être responsables d'asthmes allergiques (Kurup et al., 2002). Les algues se retrouvent présentes dans les particules suite à l'envolée d'embruns marins. Les bactéries présentes sont en grande partie des bactéries impliquées dans la décomposition et la fertilité des sols.

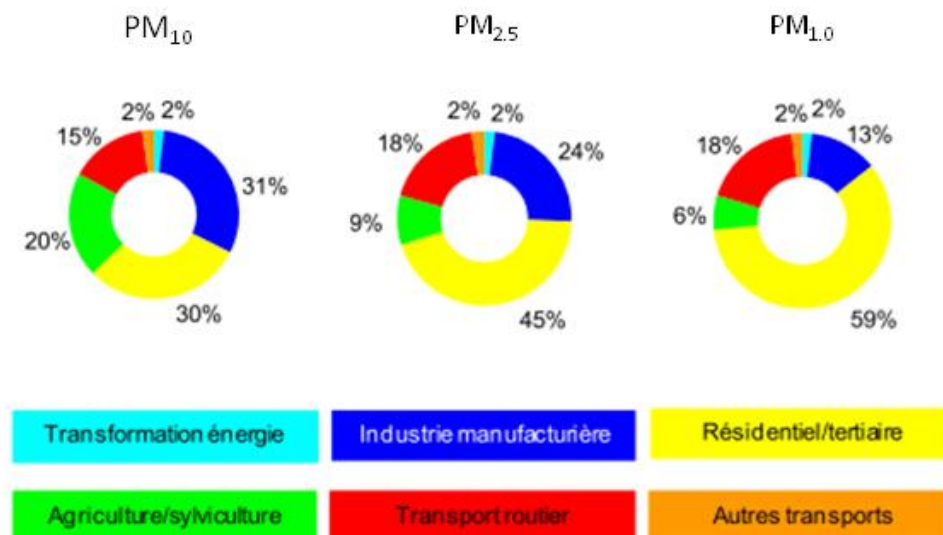
#### 2.1.2.2 Sources anthropiques

En 2011, en France, les émissions totales de particules (TSP) représentaient 878 kt avec pour les  $PM_{10}$  et les  $PM_{2.5}$  respectivement 260 kt et 173 kt (CITEPA., 2013). Les émissions de particules tendent depuis quelques années à diminuer avec une réduction de l'émission des TSP, en France, de 29% entre 1990 et 2011 (CITEPA., 2013). La contribution des différentes sources va être variable et ce dépendamment de la taille des particules considérée. Parmi les secteurs les plus producteurs de particules sont retrouvés (Fig.5) :

- L'agriculture, associée à l'émission d'environ 52% des TSP. Le travail des sols et la récolte et gestion des résidus sont à l'origine de 83% des émissions de TSP agricoles. En revanche, l'agriculture est à l'origine de 20% des émissions de  $PM_{10}$  et 9% des  $PM_{2.5}$ . De plus, à l'inverse des TSP pour lesquelles le travail du sol génère la majorité des émissions, les  $PM_{2.5}$  agricoles sont issues pour 20% de l'élevage et seulement de 14% du labour.
- L'industrie manufacturière, notamment l'incinération des déchets, la métallurgie, la cimenterie ou encore les centrales thermiques cause 31% des émissions de TSP. L'apport des industries manufacturières dans l'aérosol particulaire est plus conséquent pour les  $PM_{10}$ , où 31% sont issus de ces industries que pour les  $PM_{2.5}$ , où 24% sont issus des industries manufacturières.
- Le résidentiel, en particulier la combustion du bois, charbon ou fioul, responsable de l'émission de 10% des TSP. 30% des  $PM_{10}$  sont issus du secteur résidentiel et la contribution

de ce secteur est d'autant plus importante que la taille des particules est faible, avec 45% pour les  $PM_{2.5}$  et 59% pour les  $PM_{1.0}$ .

- Les transports, représentant 6% des émissions de TSP. Cependant, en France, 17% des  $PM_{10}$  et 20% des  $PM_{2.5}$  sont issus des transports. En Europe, en 2012, 27% des  $PM_{2.5}$  seraient issus du transport routier. Parmi ces 27%, 10% seraient issus des échappements routiers, 5% seraient liés au transport routier hors échappements ce qui prend en compte les résidus de freinage et de pneumatique, 10% issues du trafic maritime international, environ 2% dus au trafic maritime national et une très faible participation de l'aviation nationale et internationale et des chemins de fer.
- La distribution et transformation d'énergie sont à l'origine d'environ 1% de l'émission des TSP et de 2% à la fois des  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$  et  $PM_{1.0}$ .



**Fig.4.** Principales sources d'émission des  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$  et  $PM_{1.0}$ , en 2011, en France métropolitaine d'après CITEPA / FORMAT SECTEN – Avril 2013.

### 2.1.3 Particules secondaires.

Les particules secondaires sont formées par des processus physico-chimiques complexes dans l'atmosphère notamment par des processus de nucléation ou de condensation, à partir de précurseurs gazeux (Delmas et al., 2005 ; Buseck and Adachi., 2008). L'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), l'ammoniac ( $NH_3$ ) ou d'autres amines, ainsi que l'eau semblent être impliqués dans ce processus (Benson et al., 2011 ; Kirkby et al., 2011), de formation d'aérosols

inorganiques secondaires (AIS). De même, les COV peuvent participer à la formation d'aérosols organiques secondaires (Vaattovaara et al., 2006).

La conversion gaz-particule permet de former les particules secondaires (Pankow., 1994). Par exemple, le  $\text{NH}_3$  peut se combiner avec l'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ), ou encore l'acide chlorhydrique ( $\text{HCl}$ ) pour former des sels d'ammonium (Tang and Munkelwitz., 1994). Ces différents processus vont permettre la formation de sulfates d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) et de nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). La formation de sulfates d'ammonium se fait suite à l'oxydation de composés d'oxydes de soufre ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_3$ ) qui favorise la formation d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  qui peut, à son tour, facilement passer en phase particulaire par nucléation ou condensation et qui peut être neutralisée par de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et donc former du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Almeida et al., 2013). La formation de nitrate d'ammonium se fait à partir d'oxydes d'azote ( $\text{NO}_2$ ) qui favorisent la formation d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) qui a tendance à rester sous sa forme gazeuse du fait de sa pression de vapeur saturante élevée. L'acide nitrique peut passer en phase particulaire par réaction avec l'ammoniac et donc former du  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . De plus, en raison de l'hygroscopicité de nombreuses espèces inorganiques, l'eau peut favoriser l'augmentation de la taille des particules et leur masse (Petters and Kreidenweis., 2007). Les sulfates et nitrates d'ammonium sont des composants majoritaires de l'aérosol particulaire de fine taille (WHO, 2000).

Concernant les aérosols organiques secondaires (AOS), ils peuvent être issus de l'oxydation de composés organiques volatils (COV) provenant de sources naturelles, notamment biogéniques, ou anthropiques (Chen and Griffin., 2005).

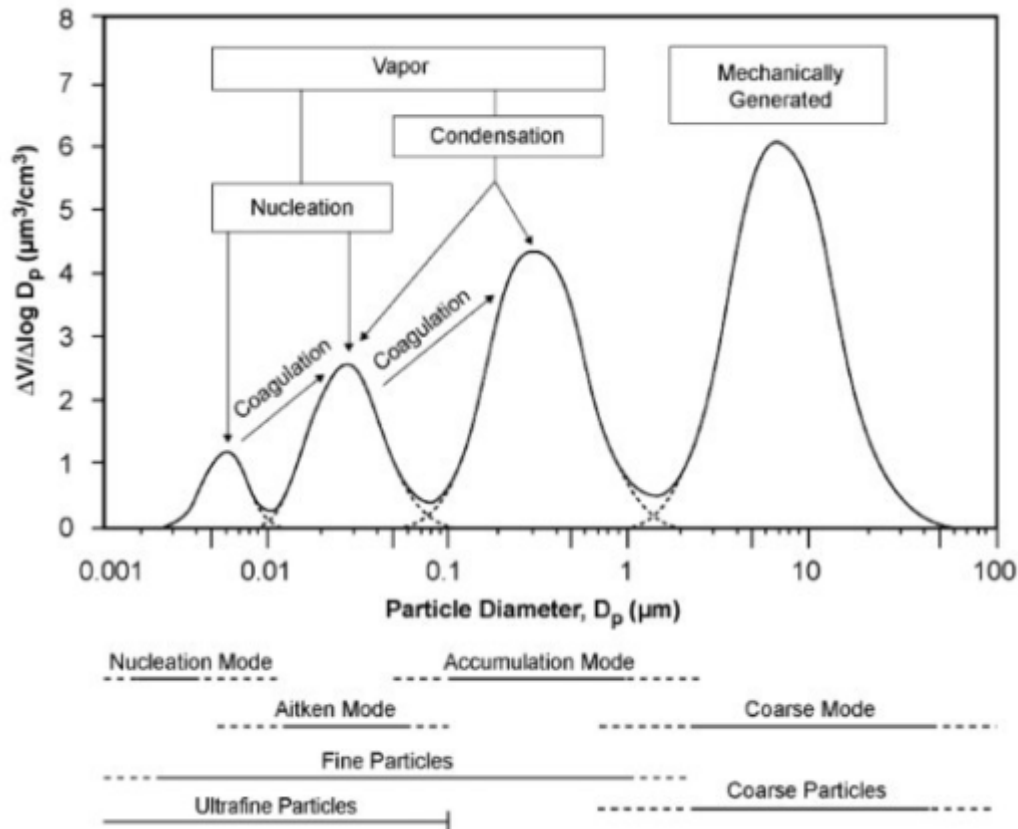
#### 2.1.4 Transport et dépôt des particules dans l'atmosphère

Une fois émises dans l'atmosphère, les particules vont rester en suspension de quelques heures à quelques semaines et parcourir des dizaines voire des milliers de kilomètres. Leur temps de résidence dans l'atmosphère dépend de leurs propriétés physiques notamment leur Dae ou des conditions météorologiques telles que de la vitesse des vents ou la fréquence des précipitations (Zufall et al., 1998). Les propriétés physico-chimiques des aérosols sont susceptibles d'évoluer rapidement. En effet, au cours de leur transport, les particules sont sujettes à de nombreuses transformations physico-chimiques (Bates et al., 2008) (Fig.6). En fonction de leurs tailles, masses, surfaces et nombres, les particules sont regroupées dans quatre

modes différents : Le mode de nucléation (environ 10 nm) et le mode d'Aitken (jusqu'à 100 nm) pour les particules ultrafines, le mode d'accumulation pour les PM de 100 à 1000 nm et les particules plus grossières de plus de 1000 nm (Seinfeld and Pandis., 2006 ; Buseck and Adachi., 2008) (Fig.5).

- La condensation et nucléation se produisent lors de la conversion gaz-particule et favorisent la formation de l'aérosol secondaire majoritairement composé de particules fines d'environ 10 nm de diamètre. La nucléation dépend de facteurs tels que la concentration des précurseurs gazeux, la température ou l'humidité (Seinfeld and Pandis., 1998 ; Jung et al., 2006 ; Stortini et al., 2009).
- Le mode d'Aitken est constitué de particules formées à partir des mécanismes de coagulation et de condensation des particules du mode de nucléation. Ces particules sont comprises entre 10 et 100 nm (Cohen and McCammon., 2001 ; McMurry et al., 2004).
- Les modes d'accumulation et grossier sont constitués de particules généralement issues de processus mécaniques naturels tels que les embruns marins, l'érosion des sols ou anthropiques tels que les travaux de la route ou des bâtiments ou encore l'usure des pneus ou freins (Jaffrezo et al., 1993 ; Bloss et al., 2009).

Les particules atmosphériques se déposent sur les sols par des processus de dépôts secs ou par dépôts humides dits de lessivage et généralement associés aux précipitations (Seinfeld and Pandis., 1998). Les PM de fraction grossière se déposent par sédimentation et sont généralement retrouvées à quelques dizaines de kilomètres de leur lieu d'émission, sauf pour les cas particuliers des réenvols de poussières sahariennes (Arimoto et al., 1995) ou issues du volcanisme. Les particules ultrafines des modes de nucléation et Aitken sont régies par des mouvements brownien, à savoir les mouvements aléatoires qui se produisent dans l'air. Ces mouvements rapides entraînent des collisions avec d'autres particules favorisant la formation de particules plus grosses leur permettant de parcourir un maximum de quelques kilomètres (Hussein et al., 2005 ; Jeong et al., 2011). Par conséquent, les particules fines du mode d'accumulation, notamment les PM<sub>2.5</sub>, sont les particules qui peuvent être transportées sur de longues distances car elles ne sont ni soumises aux mouvements brownien ni à la sédimentation (Hussein et al., 2005).



**Fig.5.** Distribution de la taille des particules présentes dans l’atmosphère selon quatre modes : nucléation, Aitken, accumulation et grossier. Les principaux mécanismes participant à la formation de ces quatre modes sont également représentés. V = volume, Dp = diamètre des particules. (USEPA., 2004).

### 2.1.5 Composition particulaire.

Les PM sont généralement composées de carbone élémentaire et de carbone organique (acides carboxyliques, substances humiques, HAP, etc.), des composés d’origine biologique, d’éléments minéraux, de sels, de métaux et d’autres composés qui sont actuellement non identifiés (Horvath et al., 1996 ; Seinfeld and Pandis, 1998 ; Turpin et al., 2000 ; Putaud et al., 2004 ; Hodzic et al., 2006 ; Querol et al., 2009 ; Philip et al., 2014).

- Le carbone élémentaire (EC : *Elementary Carbon*) existe sous forme cristalline appelé carbone graphitique. Ce carbone est essentiellement d’origine anthropique, issue de processus de combustion incomplète notamment les suies de diesel ou issue de débris de matériaux carbonés, par exemple, de l’abrasion des pneus. Le CE est un bon traceur du trafic routier. Les principaux émetteurs de CE sont les moteurs diesel routiers ou non routiers et également les feux ouverts. (Chow et al., 2011). Le CE est susceptible, du fait de ses propriétés de surface,

d'adsorber de nombreux composés semi-volatils, majoritairement des composés comprenant les chaînes carbonées de C12 à C20, tels que les HAP (Dachs et al., 2000).

- Le carbone organique (OC : *Organic Carbon*) se retrouve principalement sous la forme de matière organique (MO) qui représente la matière composée de carbone et d'autres atomes tels que l'oxygène, l'azote ou l'hydrogène. La MO particulaire est issue de la combustion incomplète notamment des feux de bois. Aux Etats-Unis, les principaux émetteurs de MO sont le chauffage au bois résidentiel et les feux de forêts (Chow et al., 2011). La MO comprend également des particules biologiques telles que des débris végétaux, du pollen, des spores ou des micro-organismes dont les bactéries, champignons ou algues. La MO peut également se condenser sur des particules, c'est le cas de certains gaz organiques volatils qui peuvent être oxydés ou nitrés par des processus (3.1.3) de nucléation ou adsorption sur des aérosols particuliers préexistants. Plus de 200 composés organiques ont été identifiés dont des alcanes, alcènes, aromatiques, HAP, PCB, aldéhydes, cétones, des alcools et bien d'autres composés (Seinfeld and Pandis, 1998). (CFHA., 2007).

- Les sels sont en majorité des sels marins ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) fortement présents en bordure de mer ; ils peuvent également être issus des sels de voirie.

- Les sulfates d'ammonium et nitrate d'ammonium sont des particules secondaires formées dans l'atmosphère à partir de COV, du  $\text{SO}_2$  ou du  $\text{NH}_3$  (voir 3.1.3).

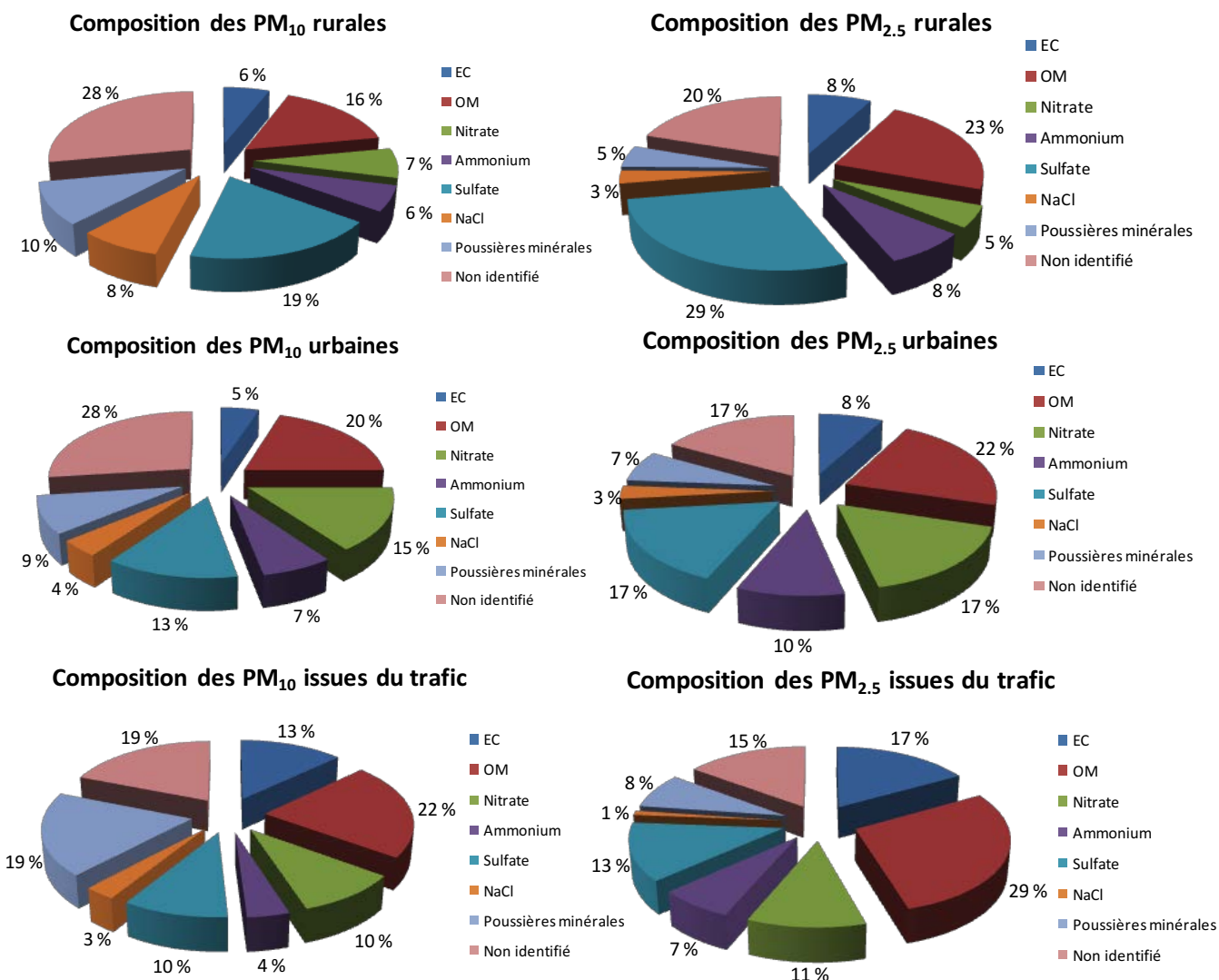
- Les composés minéraux tels que les silicates d'aluminium, carbonate de calcium, sulfate de calcium ou oxydes de fer peuvent être naturels et anthropiques. Ils proviennent des chantiers, des activités agricoles et des processus de soulèvement de poussières après abrasion des routes ou érosion des sols.

- Les éléments métalliques (métaux, métalloïdes) sont issus de l'industrie métallurgique ou cimentière, de processus catalytiques, d'incinération de déchets, ou d'émissions de véhicules ne provenant pas des gaz d'échappement tels l'abrasion des pneus ou des freins. Ils peuvent avoir une origine naturelle, lors d'éruption volcanique ou de particules terrigènes (Allen et al., 2001). Parmi les éléments métalliques présents, des éléments dits majeurs sont fortement concentrés dans la croûte terrestre, il s'agit par exemple du Fe, Al, Ca, Na, K ou Mg. Les éléments traces, quant à eux, sont peu présents dans la croûte terrestre, c'est le cas notamment du Ni, As, Cd ou Cr.

### 2.1.6 Caractérisation chimique des PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub>.

Les PM sont composées des différentes espèces chimiques, préalablement décrites, dans des proportions qui sont variables en fonction de la granulométrie de l'aérosol. Leur composition chimique peut dépendre des sources et de l'intensité des émissions (industrielle, urbaine ou rurale), de la saisonnalité, des conditions météorologiques, de la topographie locale, du vieillissement des composés et des interactions physico-chimiques qui existent entre les constituants physiques, chimiques et biologiques de ces aérosols, ce qui complique encore davantage l'interprétation des résultats toxicologiques. (Buschini et al., 2001 ; Vecchi et al., 2004).

Une étude menée par Putaud et ses collaborateurs décrit la composition particulière moyenne des PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> mesurées dans différentes villes Européennes montrant des différences de composition chimique selon le lieu de prélèvement, que cela soit en milieu rural, urbain ou trafic. Une étude plus récente de la même équipe, réalisée en 2010 dans une soixantaine de villes européennes vient confirmer les résultats obtenus en 2004 (Putaud et al., 2010). Les résultats de ces deux études montrent que le CE est fortement lié au trafic routier, avec 13% de la masse des PM<sub>10</sub> et 17 % de la masse des PM<sub>2.5</sub> pour les prélèvements issus du trafic routier comparés à 6 % et 8 % pour les PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> respectivement, prélevées en milieu rural. De plus, une étude réalisée à Hong Kong montre des différences importantes dans la composition des PM<sub>2.5</sub> urbaines que cela soit lors de la mesure globale du microenvironnement urbain ou lors de mesures réalisées à proximité de routes urbaines, périurbaines ou encore sous un tunnel urbain. Ces résultats confirment que le CE est fortement lié à l'activité des véhicules routiers, avec plus de 50% de la masse des PM<sub>2.5</sub> sous tunnel et plus de 30% à proximité des routes. La mesure ambiante quant à elle, montre des résultats plus faibles puisqu'elle permet de mesurer à la fois les PM<sub>2.5</sub> issues du trafic routier mais également les PM<sub>2.5</sub> issues du tertiaire et du secteurs industriel (Cheng et al., 2010).

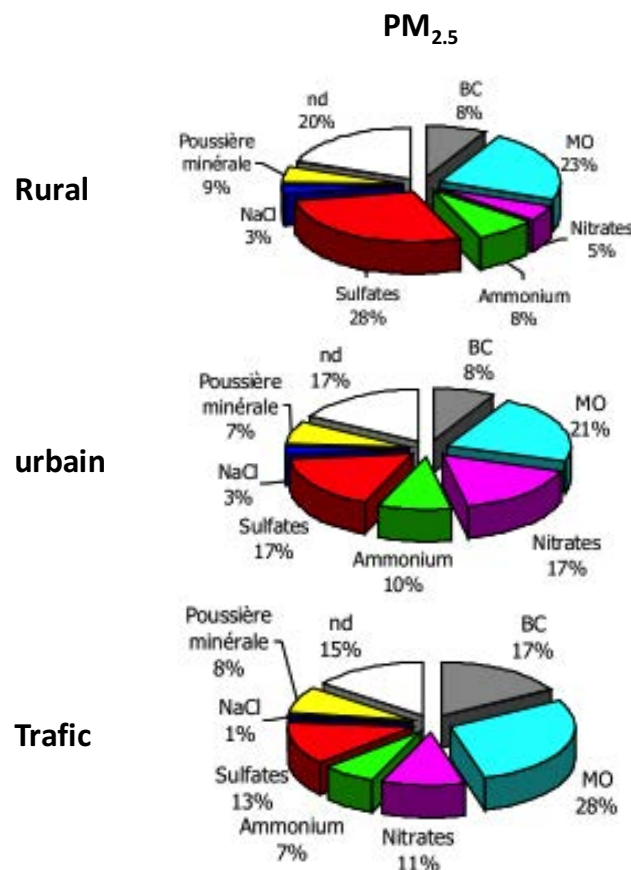


**Fig.6** : Mesure de la composition chimique moyenne des PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> issues de zones rurales, urbaines ou trafics, mesurées dans plusieurs agglomérations Européennes. D'après Putaud et al., (2004).

Ces résultats confirment également que les particules plus fines telles que les PM<sub>2.5</sub> présentent des concentrations en CE plus importantes que les PM<sub>10</sub>. Une augmentation de la MO est observée dans les échantillons issus du trafic à la fois dans les PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub>. Les ions nitrates dérivent des NO<sub>x</sub> qui sont issus pour environ 40% des transports routiers et pour 20% de la production d'énergie et de chauffage ; par conséquent, il est logique de les retrouver plus fortement concentrés en milieu urbain comparé au milieu rural. Les ions ammoniums, quant à eux, présentent une concentration importante en milieu rural et également en milieu urbain que cela soit pour les PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub>. En effet, ces ions sont issus de NH<sub>3</sub> qui est émis par les activités agricoles, notamment l'élevage ou l'utilisation d'engrais ou pesticides. De plus, les véhicules de type diesel contribuent également à l'émission de NO<sub>x</sub> qui sont à l'origine des concentrations



de  $\text{NO}_2$  et participent à la formation de particules secondaires. Les  $\text{SO}_x$  sont issus de la combustion du fuel ou du charbon, ils sont également issus des sels de mer (Seinfeld and Pandis, 2006). Les ions sulfates générés à partir des  $\text{SO}_x$  se retrouvent fortement présents dans les aérosols ruraux ; en effet, le chauffage rural utilise davantage de fuel ou de charbon. Les composés minéraux proviennent du travail du sol et du soulèvement de poussières lié à l'abrasion ou à l'érosion des routes et des sols. Ces composés sont majoritairement retrouvés en zone rurale où l'érosion des sols est la plus importante et également proche du trafic routier qui favorise l'abrasion des routes et le ré-englissement. Les composés minéraux sont, quant à eux, majoritairement présents dans les  $\text{PM}_{10}$  car issus de processus de formations mécaniques (Fig.6). En France, une étude réalisée en région parisienne par AirParif a évalué la composition des  $\text{PM}_{10}$  et  $\text{PM}_{2.5}$  à la fois sur des sites ruraux, urbains ou trafic et les résultats de cette étude confirment que les concentrations mesurées à Paris sont proches de celles mesurées en moyenne sur l'Europe (Fig.7).



**Fig.7** : Mesure de la composition chimique moyenne des  $\text{PM}_{2.5}$  issues de zones rurales, urbaines ou trafics, mesurées dans l'agglomération Parisienne. D'après Airparif., 2011.

**En conclusion, les PM présentent des variations importantes de leur composition chimique, en lien notamment avec la proximité des sources et avec la variabilité temporelle (journalière ou saisonnière), induisant une mauvaise compréhension de leurs effets sur la santé. En effet, la composition précise de l'aérosol particulaire, notamment sa composition chimique, son évolution au cours du temps mais également sa concentration dans l'air restent difficiles à appréhender. De plus, cette variabilité spatio-temporelle pourrait expliquer en partie, les effets variés observés sur la santé qui sont liés à l'exposition très changeante à ces particules.**

## 2.2 Composition et sources des métaux associés aux PM<sub>2.5</sub> urbaines.

Les éléments-traces métalliques sont persistants dans l'environnement et présentent des effets néfastes sur la santé. L'exposition à ces métaux est liée à l'apparition de retards développementaux ou encore à l'augmentation de l'incidence de certains cancers. (WHO, 2007). Dans notre étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux effets toxiques des PM<sub>2.5</sub> urbaines et notamment à l'implication éventuelle que pourraient avoir les métaux associés aux PM<sub>2.5</sub> dans la cancérogenèse pulmonaire. Nous attacherons une importance toute particulière aux métaux classés cancérogènes pour l'homme et également à certains métaux traceurs de la pollution urbaine.

### 2.2.1 Généralités sur les sources d'émission des métaux.

Les PM<sub>2.5</sub> urbaines sont majoritairement issues du secteur résidentiel et du transport routier (Fernandez-Camacho et al., 2012). Parmi les différents composés particulaires, les métaux sont présents en très faible proportion (Zhang et al., 2004). Les procédés industriels tels que le raffinage des métaux ou la combustion de combustibles fossiles et le trafic de véhicules motorisés contribuent fortement aux émissions de métaux dans l'atmosphère (Nriagu., 1989 ; Johnston and Wexler., 1995 ; Jang et al., 2007, Wu et al., 2007, Gugamsetty et al., 2012). Les métaux présents dans les particules peuvent également être issus de ressources naturelles (Stone et al., 2011). Les éléments issus de sources crustales, tels que Al, Ca, Fe, K, Mn, Mg, Si se retrouvent en plus fortes proportions dans la fraction grossière des PM (Fernandez Espinosa et al., 2001 ; Sternbeck et al., 2002, Birmili et al., 2006 ; Ny and Lee., 2011). Au contraire, les métaux issus de l'activité anthropique tels que Cu, Zn, Pb, V, As, Cd, Cr, Ni sont davantage

concentrés dans la fraction fine des PM (Fang et al., 2000 ; Fernandez Espinosa et al., 2001 ; Manoli et al., 2002 ; Utsunomiya et al., 2004 ; Mbengue et al., 2014). Bien qu'ils soient faiblement concentrés dans les particules par rapport à d'autres composés, une meilleure évaluation de leur concentration reste indispensable pour apprécier le niveau d'exposition de la population aux métaux et leurs effets sur la santé. (Schroeder et al., 1987, Lighty et al., 2000).

## 2.2.2 Métaux traceurs urbains.

### 2.2.2.1 Métaux issus du trafic routier.

Le trafic routier contribue de manière notable à l'émission de certains métaux présentant une toxicité importante. En effet, en Suède, Bergback et ses collaborateurs ont montré que 90% du Cd, 40% du Cu, plus de 99% du Cr et du Ni, 85% du Pb et 80% du Zn proviennent du transport automobile. En zone urbaine, le trafic routier est le principal émetteur de métaux qui peuvent être issus de produits de combustion des carburants, de résidus de freinage et de pneumatiques, de matériaux de construction des routes et de la ressuspension de poussières des sols (Gertler et al., 2000 ; Pakkanen et al., 2001 ; Kothai et al., 2008 ; Apeageyi et al., 2011) (Fig.9).

Il a été montré que la ressuspension des sols en milieu urbain peut représenter jusqu'à 8% de la quantité totale de PM<sub>2.5</sub> urbaines (Andrade et al., 2012). Les poussières des routes proviennent de différentes sources et leur formation et composition dépendent du climat, de l'activité humaine et également de la composition des sols de la zone environnante (Lu et al. 2009 ; Karmacharya and Shakya, 2012). Les métaux présents sur les routes proviennent de la sédimentation et de l'impaction des particules, d'effluents industriels, de résidus d'huiles et de pièces de voitures ou encore de matériaux de fabrication des routes (Li et al., 2001 ; Karmacharya and Shakya., 2012). Les principaux métaux retrouvés dans les résidus de route sont le Si, Fe, Cu, Mn, Zn, Pb, Ni, Cr et le Cd par ordre décroissant. (Han et al., 2013 ; Hetem and Andrade., 2016).

Les automobiles sont à l'origine de l'émission de particules dont la composition en métaux varie notamment en fonction du carburant utilisé. Les particules émises par les véhicules diesel sont particulièrement préoccupantes du fait de leur cancérogénicité avérée. Des filtres à particules diesel sont développés pour tenter de réduire ces émissions. Toutefois, les particules ultrafines ne sont pas arrêtées par ces filtres. Les métaux retrouvés dans les particules diesel sont le Ca, Al, Na, Ba, Zn, Fe, Cr, Cu, Mg et également en quantité moindre, le Cd, As,

le Ni ou le Se (Gross et al., 2000 ; Pulles et al., 2012). Les anciens moteurs à essence étaient d'importants émetteurs de Pb mais ces émissions ont fortement diminué depuis l'utilisation de carburants sans plomb tétra-éthyle. Cependant, des concentrations en Pb de l'ordre de 2 ppb (partie par billion =  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) sont encore émises par les véhicules à essence (Fig.8.). Les émissions des moteurs à essence sont principalement enrichies en Fe, Ca, Zn qui proviennent des additifs des huiles lubrifiantes (Morawska et Zhang., 2002). D'autres métaux tels que Hg, Cr, Cu, Ni, Pb, As, Cd, Se sont également détectés. Une étude a mesuré les concentrations en éléments-traces métalliques générés par des véhicules diesel et essence européens et a montré que la concentration de certains métaux classés cancérigènes avérés pour l'homme, tels que le Ni, As, ou Cd, est plus importante dans les combustibles à essence que diesel (Pulles et al., 2012) (Fig.8).

Les résidus de freinage sont générés suite à des décélération importantes entraînant un échauffement par frottement et donc l'émission de particules par les freins. De nombreux métaux sont contenus dans ces résidus de freinage tels que Cu, Zn, Sb, Ba, Fe, Ca, Pb, Mo, Mn, Al (Fukuzaki et al., 1986 ; Sternbeck et al., 2002 ; Grieshop et al., 2006 ; Dongarrà et al., 2009 ; Gietl et al., 2010), parmi lesquels le Cu et le Zn sont fortement retrouvés (Councell et al., 2004 ; Johansson et al., 2009).

L'usure des pneus participe à l'émission importante de métaux, le Zn est l'un des principaux métaux émis par cette source (Adachi et Tainosho., 2004). D'autres métaux sont issus de ces résidus de pneumatiques tels que Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni et le Pb (Legret and Pagotto., 1999a ; Davis et al., 2001 ; Wåhlin et al., 2006 ; Apeageyi et al., 2011).

Geometric averages and 95% confidence intervals for metal concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in petrol and diesel oil in Europe (assuming log-normal distributions).

Metal concentrations in fuel ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Se	Zn
Petrol	Average	0.27	0.26	5.3	4.3	7.5	2.3	1.6	0.18	33
	Low	0.012	0.0038	0.14	0.14	0.42	0.02	0.035	0.04	0.19
	High	1.7	1.5	28	23	31	6.1	9.7	0.55	240
	Detection limit	0.1	0.1	0.1	0.5	0.3	0.2	0.05	0.2	0.2
	<b>Number above detection limit</b>	<b>70</b>	<b>81</b>	<b>65</b>	<b>68</b>	<b>65</b>	<b>71</b>	<b>64</b>	<b>76</b>	<b>65</b>
Diesel	Average	<0.05	<0.025	8.7	6.3	2.4	0.12	0.4	<0.05	18
	Low			0.17	0.029	1		0.032		0.18
	High			69	40	4.7		1.1		130
	Detection limit	0.1	0.05	1.2	0.3	0.3	0.1	0.3	0.1	1.1
	<b>Number above detection limit</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>102</b>	<b>87</b>	<b>110</b>	<b>6</b>	<b>26</b>	<b>0</b>	<b>108</b>

**Fig.8** : Concentration des métaux classés cancérigènes dans les particules diesel ou essence. Pulles et al., 2012.

### 2.2.2.2 Métaux issus de l'activité tertiaire en zone urbaine.

Dans le monde, de nombreux appareils de combustion de la biomasse sont utilisés à la fois pour la cuisine et le chauffage (Viau et al., 2000). Le chauffage domestique représente une source importante de particules issues de la combustion (Vecchi et al., 2004). La combustion du bois, par les cheminées, poêles à bois ou à pellets est une source connue d'éléments traces tels que As, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn (Krook et al., 2004). Les chauffages au fuel et au charbon sont de moins en moins utilisés en ville. Le fuel contient principalement du Fe, Ni, V, Zn et également de Al, Ca, Mg, Si, Na, alors que du Mn, Co, Ba sont classiquement ajoutés afin de supprimer les suies et de contrôler la corrosion des récipients (EPA., 2002). La combustion de charbon conduit à l'émission de Al, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Se (Morawska and Zhang., 2002) auxquels sont parfois associés Cs, K, Rb (Godoy et al., 2005) (Fig.9).

<b>Sources urbaines</b>		<b>Métaux fréquemment émis par ces sources</b>
<b>Trafic routier</b>	Résidus de route	<b>Fe, Cu, Mn, Zn, Pb, Ni, Cr</b>
	Combustion diesel	<b>Ca, Al, Na, Ba, Zn, Fe, Cr, Cu, Mg, Ni, As, Cd, Se</b>
	Combustion essence	<b>Fe, Ca, Zn, Hg, Cr, Cu, Ni, Pb, As, Cd, Se</b>
	Résidus de freins	Cu, Zn, Sb, Ba
	Résidus de pneus	Zn, Fe
<b>Combustion résidentielle</b>	Combustion bois	As, Cu, Zn, Ni, Cr, Hg, Pb
	Combustion fuel/ charbon	<b>Fe, Ni, V, Zn, Al, Ca, Mg, Si, Na</b> Al, As, Bi, Co, Cr, Cs, Cu, K, Rb Se

**Fig.9** : Tableau récapitulatif des principaux éléments émis par des sources urbaines.

## 2.3 Bioaccessibilité des métaux adsorbés aux PM.

### 2.3.1 Définition de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité.

La bioaccessibilité est définie comme étant la fraction maximale d'un composé extractible par solubilisation dans des fluides physiologiques. Cette fraction peut être immédiatement biodisponible ou devenir disponible dans le temps. La bioaccessibilité est une facette importante de la biodisponibilité qui est définie comme étant la fraction bioaccessible d'un composé qui sera potentiellement disponible pour l'absorption dans un organisme biologique (Ruby et al., 1996 ; Brandon et al., 2006 ; Anderson and Hillwalker., 2008). La

notion de biodisponibilité prend en compte la disponibilité du contaminant entre la phase soluble et insoluble et par la suite sa disponibilité vis-à-vis de l'organisme. Elle intègre l'absorption, la distribution et l'accumulation du polluant dans l'organisme. La biodisponibilité va donc être dépendante de la nature du polluant, des propriétés du fluide dans lequel il va être solubilisé et de la cible, c'est-à-dire de l'organisme ou du tissu qui sera exposé. Pour un composé donné, la fraction de polluants bioaccessibles peut être calculée par l'équation suivante (Oomen et al., 2006 ; Uzu et al., 2010).

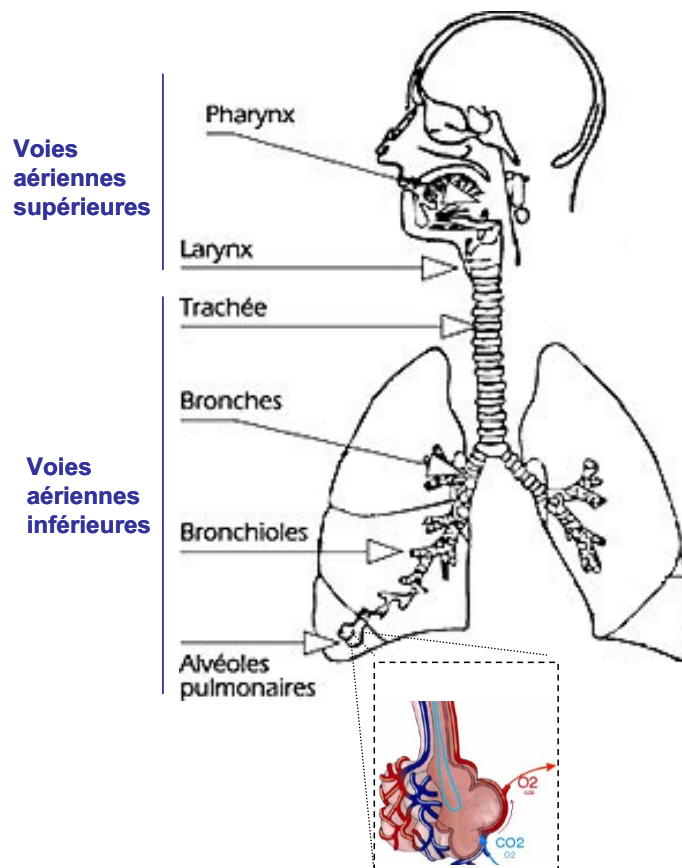
$$\text{Bioaccessibilité (\%)} = \frac{\text{Concentration extraite}}{\text{Concentration totale dans les PM}} \times 100$$

L'estimation de la bioaccessibilité des métaux, qui nous intéresse tout particulièrement dans ce projet, a pour objectif d'évaluer la toxicité de la fraction soluble ou bioaccessible et de la fraction non soluble ou particulaire des PM dans différentes matrices telles que les fluides pulmonaires (mucus, surfactant, contenus macrophagiques). Les fluides intestinaux (salive, fluides gastriques et intestinaux), la sueur et les contenus cytoplasmiques ou lysosomiques ont également été étudiés par certains auteurs (Falta et al., 2008 ; Hamel et al., 1998 ; Mukhtar and Limbeck., 2013) . Les expériences de bioaccessibilité sont classiquement réalisées *in vitro* où les particules sont incubées dans un tube à essai, pendant un temps donné et ce, en présence de différents fluides. De nombreuses études ont mesuré la bioaccessibilité des métaux dans de l'eau (Wang et al., 2002 ; Gutierrez-castillo 2005 ; Heal et al., 2005 ; Karthikeyan et al., 2006 ; Dos santos et al., 2009) d'autres dans des mimétiques reprenant uniquement la composition en sels des fluides biologiques (Mukhtar and Limbeck., 2013 ; Wiseman., 2015), enfin des investigations plus récentes tentent de se rapprocher de plus en plus des conditions *in vivo* et prennent en compte la présence de molécules biochimiques tels que les lipides ou les protéines. La bioaccessibilité *in vivo* sur des fluides directement prélevés chez l'homme est difficile à mettre en place, de par la difficulté croissante d'avoir accès à des fluides humains et ce, d'autant plus pour les fluides issus de sujets sains. Il est donc important, à l'heure actuelle, d'essayer de reconstituer de la manière la plus précise possible la composition des différents fluides biologiques et tout particulièrement les fluides pulmonaires qui nous intéressent dans cette étude.

## 2.3.2 Bioaccessibilité pulmonaire des métaux.

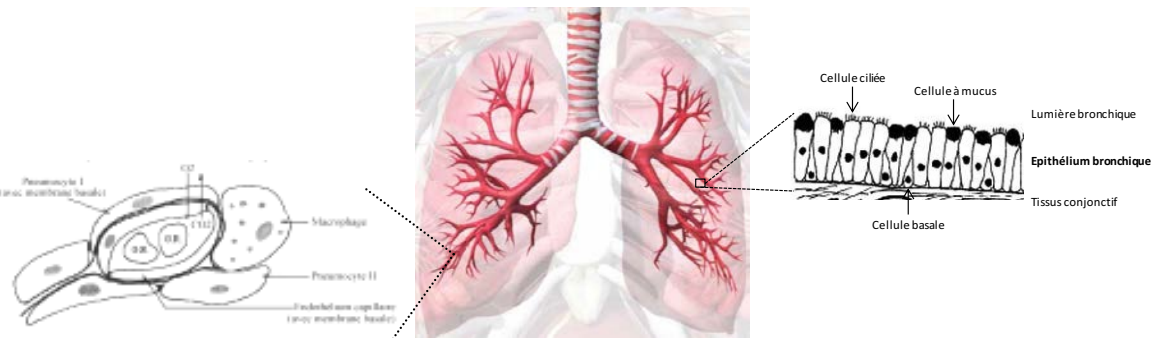
### 2.3.2.1 Structure du poumon et de l'épithélium bronchique.

L'épithélium respiratoire constitue une interface importante entre le corps et son environnement extérieur (80 à 100 m<sup>2</sup>) et est par conséquent directement en contact avec la pollution atmosphérique inhalée. La fonction principale de l'appareil respiratoire est l'échange gazeux entre le milieu extérieur et le sang. L'arbre respiratoire comprend les voies aériennes supérieures (cavité nasale, bouche, larynx et pharynx) et les voies aériennes inférieures (trachée, poumons). Les poumons comprennent l'arbre bronchique qui s'étend de la trachée aux bronchioles qui a un rôle de conduction de l'air vers le poumon périphérique. Le poumon périphérique quant à lui s'étend des bronchioles terminales aux alvéoles et permet d'effectuer les échanges gazeux. Ces échanges se font au niveau des alvéoles, et consistent à transférer l'oxygène (O<sub>2</sub>) de l'air vers le sang et inversement pour le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (Fig.10).



**Fig.10** : Appareil respiratoire. Schéma des voies aériennes supérieures composées du pharynx et Larynx et des voies aériennes inférieures composées des bronches, bronchioles et alvéoles pulmonaires.

L'épithélium bronchique est pseudostratifié et comprend un épithélium de revêtement composé de cellules caliciformes à mucus qui participent à la formation du mucus et qui constituent une ligne de défense contre l'environnement inhalé, des cellules basales impliquées dans le renouvellement cellulaire ou encore des cellules ciliées qui assurent la clairance mucociliaire (Crystal et al., 2008) et un épithélium glandulaire qui participe aux sécrétion de mucus. L'épithélium alvéolaire est un épithélium non cilié comprenant des pneumocytes de type 1 et 2 qui produisent et sécrètent le surfactant qui possède des propriétés tensio-actives qui maintient la structure de l'alvéole et l'empêche de s'affaisser. L'épithélium pulmonaire constitue une barrière physique contre les attaques extérieures et permet par la sécrétion de différents facteurs, par la clairance mucociliaire et par la clairance macrophagique, de constituer une défense forte (Diamond et al., 2000) (Fig.11).



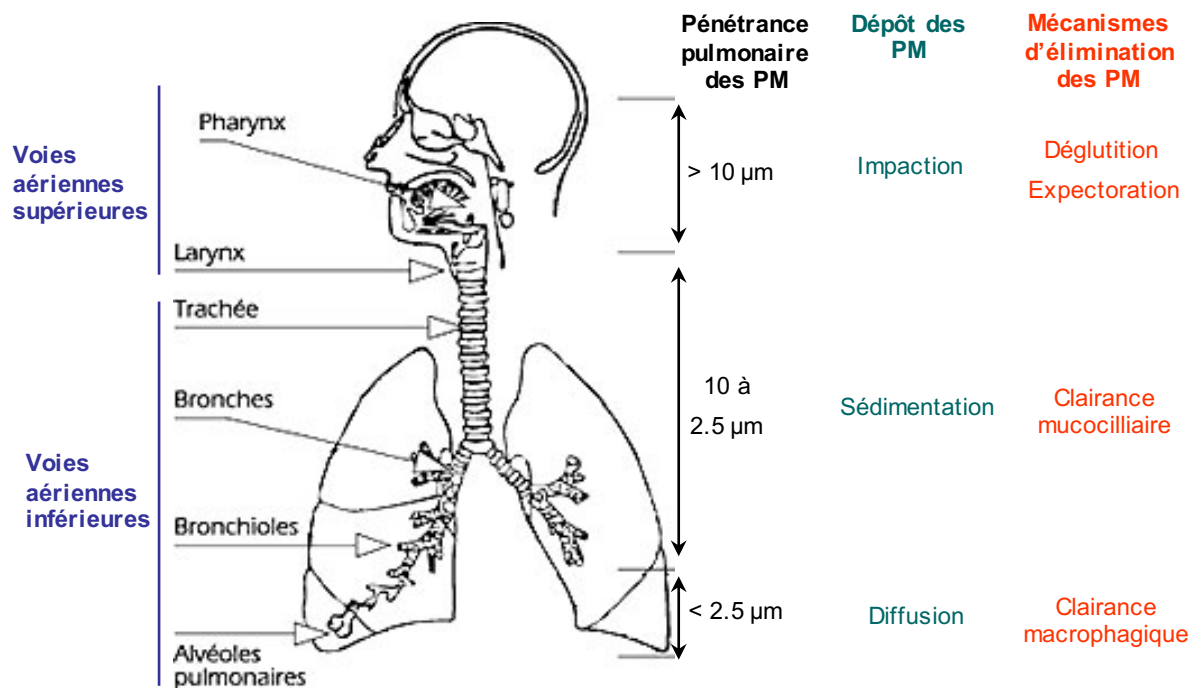
**Fig.11** : Schéma de l'épithélium bronchique composé de cellules caliciformes à mucus, de cellules basales et de cellules ciliées reposant sur un tissu conjonctif et de l'épithélium alvéolaire composé des pneumocytes 1 et 2 avec la présence de macrophages alvéolaires.

### 2.3.2.2 Pénétrance, déposition et mécanismes de clairance pulmonaire.

L'épithélium pulmonaire est directement en contact avec l'environnement notamment avec la pollution particulaire inhalée. En effet, nous respirons plus de 10 000 litres d'air par jour qui contiennent quelques millions voire milliards de particules. Ces particules inhalées peuvent induire des effets néfastes sur la santé qui vont donc être dépendants de leur pénétrance pulmonaire, mais également de leurs caractéristiques physico-chimiques, de leur contenu en composés toxiques, de leur solubilité dans les fluides pulmonaires, du niveau et du temps d'exposition et également de l'état de santé des personnes exposées. (Gavett et al., 1997 ; Laden et al., 2000 ; Baldauf et al., 2001). La pénétrance et la déposition des particules dans les poumons restent des phénomènes complexes qui ne sont pas totalement expliqués. En effet, la déposition des particules inhalées dans le poumon humain est dépendante de facteurs biologiques tels que la morphologie des poumons qui peut être différente entre l'adulte ou



l'enfant, l'humidité et la température dans l'arbre bronchique et de la physiologie respiratoire dont la fréquence de respiration qui peut être différente chez un patient ayant une pathologie respiratoire. La déposition va également être dépendante de facteurs physiques tels que la gravité, la dynamique des fluides de l'air inspiré, des capacités hygroscopiques des particules ou du diamètre particulaire (Lippmann et al., 1980 ; Varghese et al., 2009 ; Albuquerque-Silva et al., 2014). De manière générale il est admis que la pénétrance pulmonaire des PM est dépendante de leur Dae. Les particules dont le Dae est supérieur à 10  $\mu\text{m}$ , se déposent par impaction sur les parois des voies aériennes supérieures, principalement au niveau nasopharyngé, et sont rapidement éliminées par déglutition. La fraction grossière des  $\text{PM}_{10}$  (Dae entre 10 et 2.5  $\mu\text{m}$ ) pénètre la région thoracique et atteint les bronchioles terminales et s'y dépose par simple sédimentation. Engluées alors dans le mucus, les particules remontent les voies aériennes, par les mouvements vibratoires des cils, vers le carrefour aéro-digestif où elles seront dégluties ou expectorées. La fraction fine, les  $\text{PM}_{2.5}$  ( $< 2.5 \mu\text{m}$ ), pénètre jusqu'aux alvéoles et se dépose par diffusion, c'est-à-dire par des mouvements aléatoires dits mouvements browniens (Brauer et al., 2001 ; Churg et al., 2003 ; Darquenne et al., 2012). La diffusion intervient surtout au niveau des alvéoles. Les alvéoles sont composées d'un épithélium non cilié, elles ne sont donc pas épurées par des systèmes de clairance-mucociliaire, s'effectuant donc par les macrophages alvéolaires qui phagocytent les particules. Les macrophages alvéolaires sont capables de migrer vers les régions supérieures où ils peuvent exercer un effet qui reste cependant limité. De plus, la clairance macrophagique est beaucoup plus longue que la clairance mucociliaire, les particules peuvent donc s'accumuler quelques mois à quelques années (Lippmann et al., 1980 ; Heyder et al., 1986). Les particules ultrafines,  $\text{PM}_{0.1}$ , s'accumulent dans les alvéoles et sont de plus susceptibles de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre les circulations sanguines et lymphatiques (Donaldson et al., 1998 ; Buseck and Adachi., 2008) (Fig.13).



**Fig.12** : Appareil respiratoire. Pénétrance pulmonaire, dépôt et principaux mécanismes d'élimination des PM.

### 2.3.2.3 Objectifs de la bioaccessibilité pulmonaire des métaux.

Les PM sont composées d'éléments métalliques à de faibles concentrations cependant suffisantes pour être impliquées dans la toxicologie pulmonaire, notamment la cancérogenèse pulmonaire (Pritchard et al., 1996 ; Gavett et al., 1997 ; Kodavanti et al., 1998 ; Utsunomiya et al., 2004). La composition exacte des PM n'est actuellement pas connue et de nombreuses études s'intéressent donc à la meilleure compréhension de leur composition physico-chimique ainsi qu'à l'identification de leurs sources d'émission. Cependant, la détermination de la solubilité des métaux associés aux PM dans différentes solutions est un paramètre encore peu étudié alors qu'il permet de fournir des informations sur la biodisponibilité *in vivo* de ces métaux, c'est-à-dire la fraction absorbable par l'organisme au travers de la circulation systémique (Fernandez-Espinosa et al., 2000 ; Kyotani and Iwatsuki., 2002 ; Fernandez-Espinosa et al., 2002). Une fois dans l'organisme, les métaux particuliers vont être plus ou moins solubles dépendamment du fluide biologique rencontré. La biodisponibilité des métaux fixés aux PM dans les fluides pulmonaires va favoriser l'apparition de pathologies cardio-respiratoires (Costa et al., 1997 ; Wallenborn et al., 2007). De plus, certaines études épidémiologiques et toxicologiques considèrent que la fraction soluble des métaux adsorbés aux PM, notamment le Zn, Ni, Cu, V et Fe, présente une toxicité et un potentiel oxydant et pro-

inflammatoire importants comparée à la fraction insoluble de ces mêmes métaux puisqu'ils vont pouvoir gagner la circulation systémique et rejoindre des organes tel que le cœur (Frampton et al., 1999 ; Frieditis et al., 2002 ; Wallenborn et al., 2007). Même si la fraction soluble des particules peut présenter une toxicité importante, des études montrent que des particules ayant une faible solubilité peuvent également induire une toxicité notable liée à une réactivité de surface entre les différents composés (Clouter et al., 2001 ; Schins and Knaapen., 2007). En effet, des particules faiblement solubles telles que des particules diesel ou des particules de titane (TiO<sub>2</sub>) présentent une génotoxicité importante à la fois *in vitro* et *in vivo* et leur inhalation conduit à la formation de tumeurs pulmonaires chez le rat (Schins and Knaapen., 2007). Une étude montre que les deux fractions, soluble et insoluble des PM, peuvent présenter une toxicité, notamment une génotoxicité, dans les cellules A549 (Knaapen et al., 2002). L'implication de la fraction soluble ou non des métaux adsorbés aux PM, dans la cancérogenèse pulmonaire liée à leur inhalation, n'est pas clairement démontrée. En effet, dans cet exemple bien précis, il est question de la toxicologie des particules au niveau local et non systémique. La question étant de savoir si la fraction soluble, plus facilement bioaccessible, présente une toxicité plus importante au niveau local que la fraction particulaire non soluble qui elle, peut être internalisée par les cellules pulmonaires. Pour cela, l'évaluation de la bioaccessibilité des métaux liés aux PM dans des fluides bronchiques tels que des mimétiques de surfactant alvéolaire ou de mucus bronchique et l'évaluation de la toxicité de ces différentes fractions au niveau des cellules pulmonaires sont indispensables à la meilleure compréhension de la toxicologie des particules fines.

### 2.3.3 Bioaccessibilité des métaux adsorbés aux PM.

#### 2.3.3.1 Bioaccessibilité des métaux dans l'eau.

Les premières études de bioaccessibilité ont été développées afin d'évaluer les risques environnementaux associés à un sol contaminé. Dans ces études, l'extraction des métaux était majoritairement réalisée dans de l'eau (Heal et al., 2005 ; Birmili et al., 2006 ; Gravellier, 2007 ; Dos Santos et al., 2009). Alors que l'utilisation de l'eau comme extractant dans le cas de la bioaccessibilité des métaux des sols dans le cadre d'une étude environnementale se justifie, elle paraît peu adaptée dans le cas de la bioaccessibilité pulmonaire. Pourtant, de nombreuses études de bioaccessibilité pulmonaire l'utilisent comme agent d'extraction (Wang et al., 2002 ; Gutiérrez-Castillo., 2005 ; Heal et al., 2005 ; Birmili et al., 2006 ; Karthikeyan et al., 2006 ;

Dos Santos et al., 2009 ; Oller et al., 2009 ; Mugica-Álvarez et al., 2011 ; Limbeck et al., 2012). En effet, son usage présente quelques avantages techniques à savoir, l'absence de préparation, son faible coût et la minimisation des interférences lors des analyses. Le potentiel toxique des métaux adsorbés aux PM va dépendre de leur solubilisation dans les milieux physiologiques. L'extraction des métaux à l'eau ne prend pas en compte la composition parfois complexe des milieux physiologiques qui sont salins, ioniques et composés de molécules biochimiques (protéines, lipides, glucides), ce qui peut conduire à une sous-estimation ou au contraire une surestimation de la bioaccessibilité des métaux particulaires, dans ces milieux (Caboche et al., 2011 ; Mukhtar and Limbeck., 2013 ; Boisa et al., 2014). De plus les différentes études de bioaccessibilité des métaux dans l'eau montrent des résultats très contrastés, par exemple pour le Cu adsorbé au PM<sub>10</sub> dont la solubilité passe de 1% (Taiwo et al., 2014) à 54% (Karthikeyan et al., 2006), ceci étant notamment lié aux différentes conditions méthodologiques mises en œuvre (Température, pH, etc).

#### 2.3.3.2 Bioaccessibilité des métaux dans des tampons phosphate.

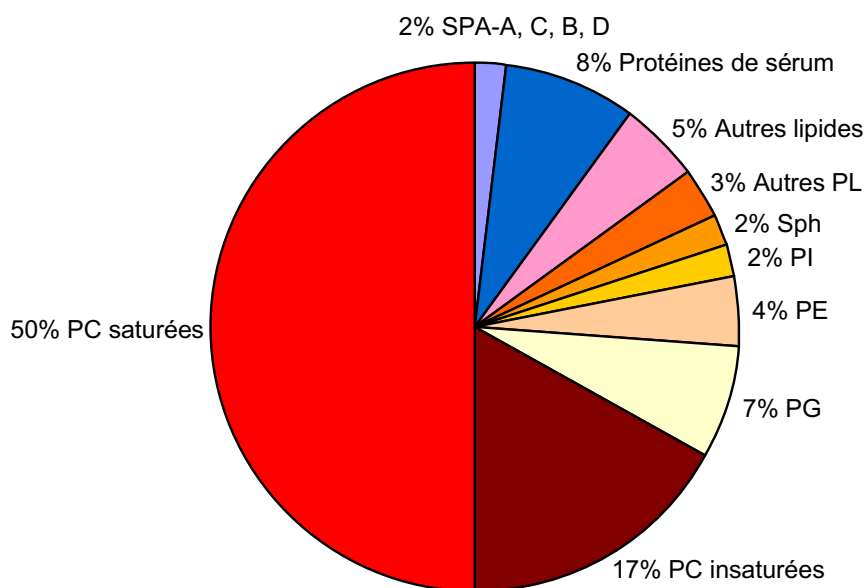
Le tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4), est une solution physiologique standard qui simule la force ionique du sérum sanguin humain. Le PBS est largement utilisé dans la recherche et également au sein de la communauté médicale comme solution de référence (Norlin et al., 2002 ; Okazaki et Gotoh., 2005). Le PBS, en tant que solution saline, est également utilisée pour estimer la bioaccessibilité pulmonaire des éléments métalliques (Midander et al., 2006). Il est composé de chlorure de sodium (NaCl), de chlorure de potassium (KCl), de phosphate de sodium dibasique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) et phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) qui vont apporter les 2 espèces acido-basiques permettant la stabilisation du pH dans le milieu. L'utilisation du PBS comme solvant permet d'évaluer le rôle des sels dans la bioaccessibilité des métaux. Cependant, l'unique présence des sels n'est pas suffisante pour évaluer la bioaccessibilité des métaux dans les fluides physiologiques, la fraction biochimique de ces fluides devant être prise en considération.

#### 2.3.3.3 Bioaccessibilité des métaux dans le surfactant alvéolaire.

La collecte d'échantillons biologiques ou de tissus humains est un élément important pour les progrès de la recherche. L'accès aux tissus biologiques humains est difficile notamment

pour des questions légales, éthiques et également dû aux faibles quantités disponibles. Cet accès est encore plus restreint pour les fluides biologiques pulmonaires, gastriques ou intestinaux et actuellement, il est quasiment impossible de s'en procurer et ce d'autant plus pour les fluides issus de sujets sains. Par conséquent, la synthèse la plus réaliste possible de mimétiques de ces fluides est indispensable aux études de bioaccessibilité. Certaines études s'intéressent à la toxicologie des PM dans les sécrétions gastriques. Pour cela, un liquide gastrique artificiel, le GST (pH 1,5) est utilisé pour les études de bioaccessibilité. Le GST imite le milieu très acide de l'estomac (Hamel et al., 1998). D'autres étudient la bioaccessibilité dans des milieux artificiels proches des fluides lysosomiaux. (ALF, pH 4,5). Le milieu ALF a pour objectif de simuler la phagocytose des PM au niveau pulmonaire (Stopford et al., 2003, Beeston et al., 2009 ; Wiseman and Zereini., 2014). La solution de Gamble (pH 7.4) est un mimétique de la composition du surfactant pulmonaire sécrété au niveau des alvéoles dans les conditions normales de sécrétion (Davies and Feddah., 2003 ; Stopford et al., 2003 ; Caboche et al., 2011).

Le surfactant pulmonaire est synthétisé par le pneumocyte de type 2 et revêt l'épithélium alvéolaire avec une épaisseur moyenne d'environ 2  $\mu\text{m}$  (Mercer et al., 1994). De plus, sa composition semble conservée entre les espèces. Le surfactant a pour rôle d'éviter le collapsus des alvéoles, d'augmenter la compliance pulmonaire c'est-à-dire la capacité du poumon à modifier son volume dépendamment de la pression à laquelle il est soumis ou encore de moduler la fonction macrophagique. Le surfactant est majoritairement composé d'eau, de sels, de lipides et de protéines (Van Golde et al., 1988 ; Goerke., 1998). Les lipides constituent 90% du matériel tensioactif. Parmi les lipides, sont majoritairement retrouvés des phospholipides (85%) qui entrent dans la composition de la membrane cellulaire. La phosphatidylcholine prédomine, suivie du phosphatidylglycerol, de la phosphatidylethanolamine, du phosphatidylinositol, de la phosphatidylserine, du plasmalogen, un analogue de la phosphatidylcholine. Parmi les phosphatidylcholine, le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est le plus important et représente de 41 à 70% des phosphatidylcholines totales (Kahn et al., 1995). Le surfactant est également composé, en moindre mesure, de lipides neutres et du cholestérol (5%). Les protéines représentent 10% de la masse des éléments présents dans le surfactant avec des protéines de sérum et des protéines spécifiques du surfactant dont les protéines SP-A et SP-D (*Surfactant protein A* ou D) sont majoritaires, suivies des protéines SP-B et SP-C. Ces protéines font partie de la super famille des Collectines, une famille de protéines impliquée dans la défense contre les bactéries, virus et champignons qui facilite la stabilité de la couche de surfactant (Hamm et al., 1992 ; Veldhuizen et al., 2011) (Fig.14).



**Fig.13 :** Composition du matériel tensioactif du surfactant pulmonaire. PC=phosphatidylcholine; PG=phosphatidylglycerol; PE=phosphatidylethanolamine; PI=phosphatidylinositol; Sph = sphingomyelin; PL = phospholipids. D’après Hamm et al., 1992.

La solution mimétique du surfactant alvéolaire couramment utilisée pour les études de bioaccessibilité est le Gamble. Cette solution a été développée pour la première fois en 1942 pour des études *in-vitro* de la toxicité pulmonaire des polluants (Gamble, 1942). A l’origine le Gamble est une solution qui reproduit la composition saline du surfactant sans prendre en compte la fraction biochimique (Moss., 1979 ; Davies and Feddah 2003 ; Roos et al., 2003). La formule d’origine du Gamble a été modifiée dans plusieurs études : Caboche et al., 2011 ont utilisé une solution nommée « *Gamble solution* » dans laquelle sont ajoutés de la glycine un acide aminé et du DPPC pour mimer la présence des lipides. Le terme « *modified Gamble's solution* » est retrouvé dans laquelle du Citrate est ajouté afin de simuler la présence de protéines et de l’acétate afin de simuler la présence d’acides organiques tels que les acides gras (Gray et al., 2010 ; Colombo et al., 2008). Les termes « *simulated lung fluid* » (Taunton et al., 2010), « *synthetic serum* » (Kanapilly et al., 1973), « *artificial interstitial fluid* » (Stopford et al., 2003), et « *pseudo alveolar fluid* » (Takaya et al., 2006) sont également retrouvés (Fig. 15). Plus récemment, une étude a développé une solution dérivée du Gamble qui comprend de l’albumine, de la cystéine, de la glycine, des mucines et du DPPC (Boisa et al., 2014). Ces auteurs ont fait le choix d’ajouter de l’albumine et des mucines qui représentent une part importante des protéines qui composent les fluides pulmonaires de manière générale (Bredberg et al., 2012) (Fig.15).

Cependant, l'utilisation de ces solutions de remplacement peut être critiquable, en effet, la structure complexe des protéines et des lipides présents dans le milieu est complètement différente du citrate ou de l'acétate. La meilleure façon de s'en approcher est de trouver une solution contenant les lipides et protéines normalement retrouvées dans le surfactant.

The composition and concentrations of *in vitro* lung bioaccessibility fluids.

Composition	Original Gamble solution	Pseudo alveolar fluid	Simulated lung fluid	Artificial interstitial fluid	Gamble solution	Modified Gamble solution	Synthetic serum	Gamble solution
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	203	212	212	203				
NH <sub>4</sub> Cl (mg L <sup>-1</sup> )					535	5300	535	118
NaCl (mg L <sup>-1</sup> )	6019	6415	6400	6193	6786	6800	6786	6400
CaCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )					22		22	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	368	255	255	368		290		225
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	71	79		71				
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )					45	510	45	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )			179					
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		148	148	142				150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	142				144		144	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )						1700		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )						1200		
NaHCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	2604	2703	2700	2604	2268	2300	2268	2700
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )						630		
NaHC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·2H <sub>2</sub> O (sodium hydrogen tartrate dihydrate) (mg L <sup>-1</sup> )		180	180					
H <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·Na·2H <sub>2</sub> O (sodium dihydrogen citrate dihydrate) (mg L <sup>-1</sup> )	97	153	153					
CH <sub>3</sub> CHOHCOONa (sodium citrate) (mg L <sup>-1</sup> )		175			52		52	160
Citric acid·H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )						420		
NaOCOC <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (sodium pyruvate) (mg L <sup>-1</sup> )		0.72	172					
NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH (glycine) (Gly) (mg L <sup>-1</sup> )		118	118		375	450	450	190
L-Cysteine (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S) (mg L <sup>-1</sup> )					121			
DPFC (dipalmitoyl phosphatidyl choline) (C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> NO <sub>8</sub> P) (mg L <sup>-1</sup> )								200
CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O (sodium acetate trihydrate) (mg L <sup>-1</sup> )	953			952				
Sodium acetate (CH <sub>3</sub> COONa) (mg L <sup>-1</sup> )						580		
HOC (COONa) (CH <sub>2</sub> COONa) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (sodium citrate dihydrate) (mg L <sup>-1</sup> )				97		590		
C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> (sodium lactate) (mg L <sup>-1</sup> )			290					
KCl (mg L <sup>-1</sup> )	298			298				
Potassium hydrogen phthalate (C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )						200		
C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> (DTPA) (pentetic acid) (mg L <sup>-1</sup> )					79			
C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> NCl (ABDAC) (mg L <sup>-1</sup> ) (benzalkonium chloride)					50			
Ascorbic acid (mg L <sup>-1</sup> )								
Uric acid (mg L <sup>-1</sup> )								
Glutathione (mg L <sup>-1</sup> )								
Albumin (mg L <sup>-1</sup> )								
Mucin (mg L <sup>-1</sup> )								
pH (adjustment with HCl)		7.6		7.4	7.3	7.4	7.3	
Reference	Moss, 1979	Takaya et al., 2006,	Taunton et al., 2010	Stopford et al., 2003	Wragg and Klinck, 2007	Gray et al., 2010;	Kanapilly et al., 1973	Caboche et al., 2011

**Fig.14** : Composition des dérivés de la solution Gamble (Boisa et al., 2014).

Pour cela, différentes solutions sont commercialisées pour l'usage hospitalier. Des mimétiques sont commercialisés et sont utilisés en clinique, principalement en néonatalogie chez les prématurés à haut risque de présenter un syndrome de détresse respiratoire lié à un déficit en surfactant pulmonaire. Ils sont prélevés chez le porc ou le bœuf et présentent une composition en lipides et protéines qui est variable, certains contiennent uniquement des lipides et d'autres des lipides et protéines. Ces solutions commerciales sont plus proches des conditions *in vivo* et leur utilisation pourrait être envisagée dans les études de bioaccessibilité pulmonaire (Fig.15).

Nom commercial	Producteur
Survanta®	Abbot Laboratories
Surfacten®	Tokoyo Tanabe
Corusurf®	Chiesi Pharmaceuticals
infasurf®	Forest Laboratories
alveofact®	Boehringer
pneumactant®	Britannia Pharmaceuticals
exosurf®	Glaxo Wellcome Co

**Fig.15** : Liste des principaux surfactants commerciaux utilisés en clinique.

#### 2.3.3.4 Bioaccessibilité des métaux dans le mucus.

Aucune étude connue n'a évalué la bioaccessibilité des métaux dans du mucus bronchique ou un mimétique de celui-ci. Cette étude est nécessaire à l'évaluation de la toxicologie des particules au niveau bronchique et notamment permettrait de mieux identifier les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse bronchique liée à l'inhalation des PM.

Le mucus est un film aqueux qui représente un écran protecteur de l'épithélium bronchique. Le mucus est produit par l'épithélium bronchique glandulaire et par les cellules caliciformes à mucus. Il joue un rôle crucial dans la protection des voies aériennes face aux pathogènes, aux particules et gaz inhalés mais aussi contre les modifications thermiques et hygrométriques de l'air inspiré. Il est également composé d'une double couche : une couche profonde facilitant le battement des cils et une couche superficielle discontinue, d'une viscosité plus importante, qui permet d'engluer les contaminants qui sont ensuite déplacés vers les voies aériennes supérieures par le mouvement vibratile des cils (Lucas and Douglas., 1934). L'efficacité de l'épuration des voies aériennes va dépendre des cils, de leur fréquence de battement et également des propriétés rhéologiques dont la viscosité, l'élasticité, la filance, l'adhésivité et la mouillabilité du mucus. Les propriétés rhéologiques du mucus sont altérées dans certaines pathologies bronchiques telles que les BPCO, l'asthme ou encore les bronchites chroniques.

Le mucus est composé d'eau, d'ions, de protéines, de glycoprotéines, de lipides et ADN (Fig.16).



Composition mucus pour 100g de matière		Composition ionique du mucus mEq/g	
<b>Eau</b>	94,79	<b>Ca</b>	6.2 ± 2,0
<b>ADN</b>	0,028	<b>P</b>	27 ± 16
<b>Carbohydate</b>	0,951	<b>Na</b>	165 ± 42
<b>protéines</b>	1	<b>Cl</b>	162 ± 60
<b>Lipides</b>	0,84	<b>K</b>	13,2 ± 5,4
<b>cendres</b>	1,13		

**Fig.16** : Composition chimique du mucus pulmonaire pour 100g de matière et composition ionique du mucus pulmonaire chez les sujets sains en mEq/g. D'après Matthwes et al., 1963.

La dernière publication relatant de l'analyse de mucus date de 1963 (Matthwes et al., 1963). Parmi les protéines, sont retrouvées des protéines impliquées dans la défense face aux micro-organismes telles que des Immunoglobulines, la lactoferrin qui chélate le fer nécessaire à la croissance bactérienne et du lysozyme impliqué dans la lyse bactérienne. Cependant, les protéines les plus abondamment présentes sont les mucines. Les mucines sont des constituants importants du mucus puisqu'elles sont responsables des propriétés visco-élastiques (Gallagher et al., 1982). Les mucines sont une famille de glycoprotéines qui peuvent être membranaires ou sécrétées dont la MUC5AC, la mucine la plus sécrétée par les cellules caliciformes à mucus (Groneberg et al., 2002).

### 2.3.3.5 Paramètres influençant la bioaccessibilité des métaux

Les valeurs de bioaccessibilité des métaux vont dépendre de plusieurs paramètres physicochimiques, de la composition ou du pH des solutions utilisées, du temps de contact entre les particules et la solution ou du ratio solide/liquide. La taille des particules et la forme chimique vont influencer la bioaccessibilité des métaux (Rasmussen., 2004 ; Zerieni et al., 2005 ; Niu et al., 2008). Les particules les plus petites présentent une surface d'échange plus élevée avec les fluides physiologiques. La bioaccessibilité est donc plus importante pour les particules de plus petites tailles (Heal et al., 2005 ; Uzu et al., 2010). La spéciation chimique influence également la bioaccessibilité (Niu et al., 2010 ; Mbengue et al., 2015). Le pH va par conséquent fortement influencer la bioaccessibilité. En effet, la bioaccessibilité est plus importante dans des mimétiques de fluides gastriques où le pH est proche de 2, comparée à celle réalisée dans l'eau ou le Gamble dont le pH est compris entre 7 et 7.4. La solubilisation des métaux est pH

dépendante et va augmenter avec la diminution du pH (Ruby et al., 1996 ; Oomen et al., 2002 ; Caneparo et al., 2006 ; Juhasz et al., 2009). Les résultats obtenus dans des solutions de pH identiques ou proches telles que l'eau et le Gamble présentent des différences de bioaccessibilité des métaux. La présence d'électrolytes et de composés organiques dans la solution Gamble favorisant la complexation des éléments va avoir une influence sur la solubilité des métaux particuliers (Caboche et al., 2011). Le temps de contact des particules avec la solution influence la bioaccessibilité dont les valeurs maximales sont généralement atteintes après 24h (Caboche et al., 2011). La bioaccessibilité dépend également du ratio liquide/solide utilisé, c'est-à-dire le rapport entre la quantité de particules mise en solution et le volume de la solution d'extraction utilisée. En effet, un ratio trop élevé peut favoriser l'agglomération des PM ce qui limite la solubilisation des métaux. Un ratio de 1/500 (g/mL) ou inférieur s'avère approprié pour éviter les phénomènes de saturation (Caboche et al., 2011). Ces différents paramètres physicochimiques, de composition et de pH des milieux ou encore de ratio solide/liquide seront étudiés dans des expériences de bioaccessibilité des métaux adsorbés aux PM réalisées sur des milieux de culture cellulaire afin d'évaluer les conditions expérimentales les plus adaptées à la fois aux études toxicologiques et aux études de bioaccessibilité.

#### 2.3.4 Conclusion sur la bioaccessibilité des différents métaux.

La bioaccessibilité des métaux particuliers va dépendre des différents paramètres décrits ci-dessus mais également de la spéciation des métaux. Le Fe présente une faible bioaccessibilité à la fois dans l'eau et dans des solutions salines telles que le Gamble (Fernandez-Espinoza et al., 2002 ; Schauer et al., 2006 ; Schleicher et al., 2011). Le Fe particulaire dans l'environnement est davantage retrouvé sous sa forme d'oxyde ou silicate peu soluble (Marris et al., 2012). L'Al présente également une faible bioaccessibilité liée à la présence importante d'alumino-silicates (Schauer et al., 2006 ; Mustafa et al., 2007 ; Dos Santos et al., 2009 ; Schneidmesser et al., 2010). Le Mn est moyennement soluble dans l'eau (Fernandez-Espinoza et al., 2002 ; Heal et al., 2005) et est davantage soluble dans les mimétiques de fluides biologiques tels qu'une solution gastrique synthétique (Falta et al., 2008) ou la solution Gamble (Schauer et al., 2006). L'As présente une forte solubilité dans l'eau (Heal et al., 2005 ; Qureshi et al., 2006) qui est encore plus importante dans le Gamble et l'ALF (Wiseman et al., 2014). L'As inorganique, en particulier l'As (V), est la forme la plus représentée dans les aérosols atmosphériques. L'As (V) présente une solubilité importante dans des fluides pulmonaires synthétiques (Huang et al., 2014). Le Cd présente une solubilité

moyenne dans le Gamble (Schauer et al., 2006) pouvant être due à la présence de ses formes les plus solubles telles que chlorure ( $\text{CdCl}_2$ ) ou sulfate ( $\text{CdSO}_4$ ). La bioaccessibilité du Zn est importante dans les solutions salines (Bikkes et al., 2001 ; Schauer et al., 2006 ; Falta et al., 2008) et peut être présent sous des formes solubles telles que les sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ), chlorure ( $\text{ZnCl}_2$ ) et carbonate ( $\text{ZnCO}_3$ ). Le Ni présente une solubilité moyenne associée à sa forme sulfate ( $\text{NiSO}_4$ ), la présence de cette forme est liée à la combustion de produits pétroliers (Fernandez Espinoza et al., 2002). Le Cu peut être présent sous sa forme soluble ( $\text{CuSO}_4$ ), il montre une solubilité moyenne dans le Gamble qui est plus importante dans l'ALF (Falta et al., 2008 ; Wiseman et al., 2014). Pour le Pb, les valeurs de bioaccessibilité sont très variables et ce dépendamment des formes rencontrées qui vont être différentes en fonction des sources d'émission ( $\text{PbS}$ ,  $\text{PbO}$ ,  $\text{PbSO}_4$ ,  $\text{PbCO}_3$  et  $\text{PbCrO}_4$ ) (Harrison and Perry., 1986 ; Ruby et al., 1999 ; Reeder and Schoonen., 2006 ; Uzu et al., 2009).

**En conclusion, les métaux majoritairement émis par une source anthropique tels que le As, Fe, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn présentent une bioaccessibilité variable dépendamment des sources d'émission et de la taille des particules. La bioaccessibilité va également dépendre de la solution utilisée, notamment de sa composition ou de son pH, du temps de contact entre les particules et la solution ou du ratio solide/liquide. Les éléments issus de la croûte terrestre dont l'Al et Fe présentent une faible bioaccessibilité quel que soit le milieu considéré, ceci étant lié à la présence de formes oxydes et silicates. Le Cu, Ni, Mn, Pb présentent une bioaccessibilité variable liée à la présence plus importante de formes solubles dont les formes sulfates et chlorures. Les métaux présentant une forte bioaccessibilité à la fois dans l'eau et les milieux salins sont le As et Zn majoritairement sous forme sulfates, chlorures, carbonates ou arséniate pour l'As.**

### 3. PM, effets sur la santé et mécanismes d'action toxique.

#### 3.1 Réglementations européennes et américaines.

La réglementation européenne en matière de particules atmosphériques, actuellement basée sur les  $PM_{10}$ , stipule que la moyenne annuelle en  $PM_{10}$  ne doit pas excéder  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , cependant, 35 dépassements journaliers au-delà de  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  sont tolérés. En Région Nord-Pas de Calais (NPdC), les 35 dépassements sont souvent observés et il est fréquent de mesurer des taux de 70 à  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Reconnaisant la dangerosité des  $PM_{2.5}$  pour la santé humaine, la commission européenne, dans la directive 2008/50/CE, a proposé de fixer le plafond de concentration moyenne annuelle des  $PM_{2.5}$  à  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Cette dernière valeur cible devra être atteinte en 2015 ou, dans la mesure du possible, doit l'être depuis 2010. Au Etats-Unis, l'agence américaine US-EPA ne définit pas de valeur annuelle pour les  $PM_{10}$ . Cependant, les concentrations en  $PM_{10}$  ne doivent pas excéder plus d'une fois  $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$  par an en moyenne sur trois ans. La valeur moyenne annuelle de  $PM_{2.5}$  est de  $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$  et la norme relative à une exposition de 24 h est de  $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Fig.17). Dans tous les cas, ces limites restent supérieures au taux de  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les  $PM_{10}$  et  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour les  $PM_{2.5}$  préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui reconnaît que l'exposition à des taux élevés de ces particules peut avoir des conséquences sanitaires importantes.

$PM_{10}$	Valeurs limites	Nombre de dépassements par an
US-EPA	$150 \mu\text{g}/\text{m}^3$	1 dépassement à $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$
2008/50/CE	$40 \mu\text{g}/\text{m}^3$	35 dépassements à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$

$PM_{2.5}$	Valeurs limites	Nombre de dépassements par an
US-EPA	$35 \mu\text{g}/\text{m}^3$	pas de dépassement
2008/50/CE	$25 \mu\text{g}/\text{m}^3$	pas de dépassement

**Fig.17 :** Tableau récapitulatif des valeurs limites et du nombre de dépassements autorisés par an pour les  $PM_{10}$  et  $PM_{2.5}$  en Europe et aux Etats Unis.

## 3.2 Etudes épidémiologiques sur l'impact des PM.

### 3.2.1 Exposition aux PM et mortalité

Les effets sanitaires des PM restent encore mal connus et sont évalués par des études cliniques, épidémiologiques et mécanistiques (OMS., 2007). De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une exposition à court et à long terme aux particules PM<sub>10</sub> et PM<sub>2.5</sub> est clairement associée à une augmentation de la mortalité. En effet, la mortalité est loin d'être négligeable puisqu'une étude de Lim et ses collaborateurs, publiée en 2012, estime que les particules ambiantes sont directement responsables de 3,2 millions de morts par an, cette mortalité faisant suite à des cardiopathies, bronchopathies ou encore des cancers (Pope et al., 2002 ; Analitis et al., 2006 ; Lim et al., 2012). En 2016, une étude réalisée par santé publique France estime que la pollution par les PM<sub>2.5</sub> serait responsable de 48 000 décès par an sur le territoire Français (Santé publique France., 2016). D'anciennes études montraient déjà un lien évident entre la mortalité pour cause cardiovasculaire et la survenue de pics de pollution aux particules (Schrenk., 1949 ; Logan., 1952 ; Bell et al., 2004). D'autres séries chronologiques ont permis d'étudier les corrélations de la mortalité, au jour le jour, en fonction des variations quotidiennes de la pollution particulaire (Klemm and Mason., 2003 ; Schwartz., 2004 ; Anderson et al., 2005 ; Ostro et al., 2006) Les résultats obtenus pour ces études restent très variables et montrent qu'une augmentation de 10 à 20 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>10</sub> ou de PM<sub>2.5</sub> peut être ou non associée à l'augmentation de la mortalité.

Enfin, de nombreux travaux se sont focalisés sur la relation entre l'exposition à long terme aux particules et la mortalité (Pope et al., 1995 ; Samet et al., 2000 ; Brunekreef and Holgate., 2002 ; Laden et al., 2006 ; Franklin et al., 2007 ; Brook et al., 2010). Ces différents travaux ont clairement montré que l'association entre l'exposition aux PM et la mortalité était plus importante pour des échelles de temps d'exposition à plus long terme. Cependant, les différentes études épidémiologiques estimant l'effet des particules à long terme sur la mortalité peuvent montrer des résultats variables, ceci étant lié à de grandes variations à la fois de l'état de santé général de la population considérée et de leur réactivité vis à vis du polluant, des différences de localisation ou saisonnières ou encore d'une variabilité dans la taille ou la composition physico-chimique de ces mêmes particules (Pelucchi et al., 2009 ; Hoek et al. 2013).

Certaines données suggèrent que l'effet des PM<sub>2.5</sub> sur l'espérance de vie peut être plus fort dans les régions urbaines, densément peuplées (Correia et al., 2013). En outre, des données

plus récentes montrent que les études réalisées dans les zones rurales sont également pertinentes. En effet, il est montré que l'exposition à de faibles concentrations ( $<10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) de  $\text{PM}_{2.5}$  ambiante est associée à une mortalité accrue liée notamment à une augmentation de la prévalence des accidents cardiovasculaires (Crouse et al., 2012). En 2012, Bell et ses collaborateurs ont montré que les variations saisonnières et géographiques autant dans la concentration que dans la composition des  $\text{PM}_{2.5}$  influencent également les hospitalisations et la mortalité liées aux maladies cardiovasculaires et respiratoires. En effet, les admissions pour ces mêmes pathologies sont plus importantes l'hiver qu'au printemps (Bell et al., 2012).

De plus, les  $\text{PM}_{2.5}$  sont associées à une mortalité plus importante que celle observée pour des particules dont le diamètre aérodynamique est plus élevé (Schwartz et al., 1996 ; Cifuentes et al., 2000), ceci pouvant non seulement être dû à leur taille mais également aux variations dans les sources d'émission et dans la composition des particules (Laden et al., 2000 ; Ostro et al., 2007 ; Chung et al., 2015 ; Crouse et al., 2016). D'après l'étude réalisée par Ostro et ses collaborateurs, la pollution des véhicules à moteur ou celle issue d'autres sources de combustion, dont le chauffage résidentiel au bois sont particulièrement impliquées dans la mortalité associée à l'exposition aux  $\text{PM}_{2.5}$  (Ostro et al., 2007). Les métaux contribuent significativement à l'augmentation de la mortalité associée à l'exposition aux  $\text{PM}_{2.5}$  (Burnett et al., 2000 ; Lippmann et al., 2006 ; Franklin et al., 2008 ; Bell et al., 2009). En effet, Franklin et ses collaborateurs ont montré que l'aluminium et le nickel sont les métaux les plus associés à la mortalité induite par les  $\text{PM}_{2.5}$ , l'arsenic et le silicium contribuant dans une moindre mesure à cet effet. (Franklin et al., 2008).

### 3.2.2 Exposition aux PM et morbidité

#### 3.2.2.1 Exposition aux PM et risques cardiovasculaires.

De nombreuses études ont montré un lien étroit entre l'exposition aux particules et la mortalité et morbidité liées à des pathologies cardiovasculaires (Pope et al., 2004 ; Miller et al., 2007 ; Chen et al., 2013). Les pathologies cardiovasculaires fréquemment observées sont les infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, des arythmies ou encore des insuffisances cardiaques particulièrement chez les personnes sensibles (Brunekreef et Holgate., 2002 ; Simkhovich et al., 2008 ; Brook et al., 2010 ; Hoek et al., 2013).

La plupart des études épidémiologiques récentes s'intéressent aux effets de l'exposition à court terme aux particules fines, notamment leur association avec l'augmentation de la

morbidité. En effet, dans une étude américaine incluant une large population de personnes de plus de 65 ans, le taux d'admissions hospitalières dû à des insuffisances cardiaques voit son risque relatif augmenter de 1,28% pour chaque augmentation de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{2.5}$  dans la même journée (Dominici et al., 2006). De plus, une étude sur les admissions aux urgences à Boston montre une association significative entre une exposition à court terme aux  $\text{PM}_{2.5}$  et le risque d'hospitalisation pour infarctus du myocarde (Zanobetti et al., 2006). Le lien entre l'exposition à court terme aux particules fines et les accidents vasculaires cérébraux reste inconstant. En effet, certains auteurs montrent qu'une augmentation à court terme de la concentration en particules dans l'air peut être associée à une incidence plus importante des accidents vasculaires cérébraux (Dominici et al., 2006 ; Chan et al., 2006), à contrario, d'autres études n'ont pas été en mesure de démontrer un tel lien (Anderson et al., 2001 ; Le Tertre et al., 2002 ; Halonen et al., 2009). De plus, une étude rapporte que les patients ayant déjà subi des accidents vasculaires cérébraux sont plus susceptibles à l'exposition aux particules fines alors qu'aucun lien n'est établi entre l'exposition aux particules et l'augmentation des accidents vasculaires cérébraux chez les personnes qui ont fait un premier épisode (Turin et al., 2012). Ces disparités peuvent, comme c'est le cas pour les études s'intéressant à la mortalité, s'expliquer par des différences entre les populations, de la méthodologie et de l'effectif utilisés, de l'étiologie des pathologies sous-jacentes, des sources, de la composition ainsi que des variations journalières des particules.

Les études à long terme montrent des résultats plus variables du fait de la multiplicité de facteurs confondants, elles nécessitent donc une robustesse avec des cohortes plus importantes à la fois en nombre de personnes, qu'en durée d'étude. Pope et ses collaborateurs ont fait le lien entre l'exposition à long terme aux particules fines et la mortalité et morbidité liées à des pathologies cardiovasculaires et ce par des mécanismes impliquant une augmentation de l'inflammation, de l'athérosclérose (Pope et al., 2002). Brook et ses collaborateurs ont montré que chaque augmentation de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , à long terme, de la concentration en  $\text{PM}_{2.5}$  est associée à une augmentation de minimum 10 % de l'incidence des pathologies cardiovasculaires (Brook et al., 2010). Une autre étude, orientée sur la santé des femmes, a montré que l'exposition chronique aux particules fines est associée à l'augmentation de 24% de l'incidence des événements cardiovasculaires (Miller et al., 2007).

D'un point de vue mécanistique, plusieurs voies vont favoriser l'apparition de pathologies cardiovasculaires suite à l'exposition aux PM, notamment aux  $\text{PM}_{2.5}$  et aux particules ultrafines. Certains auteurs décrivent une voie directe par laquelle les particules sont

directement présentées, par la voie systémique, aux organes cibles (Nemmar et al., 2001 ; Nemmar et al., 2002a ; Oberdorster et al., 2002). D'autres études mentionnent une voie indirecte initiée par les réponses inflammatoires et oxydatives pulmonaires induites suite à l'exposition aux particules. En effet, la libération de facteurs pro-thrombiques et de cytokines inflammatoires dans la circulation systémique, l'activation du système immunitaire et l'activation du système nerveux autonome peuvent favoriser l'athérosclérose ou encore les infarctus du myocarde (Donaldson et al., 2001 ; Kelly et al., 2003 ; Brook et al., 2010 ; Shrey et al., 2011).

Des études humaines d'exposition en milieu contrôlé viennent étayer les résultats obtenus dans les études épidémiologiques et montrent que l'exposition aux particules est associée à l'augmentation de facteurs inflammatoires circulants dont la protéine C réactive, une augmentation de marqueurs hémostatiques tels que le fibrinogène, une augmentation de la coagulation du sang, une vasoconstriction et favorise l'ischémie (Pope et al., 2004 ; Beckett et al., 2005 ; Mills et al., 2007 ; Ruckert et al., 2007). Ces différents facteurs vont favoriser la survenue de l'athérosclérose, de thrombose ou d'autres pathologies cardiaques ischémiques (Libby et al., 2001 ; Willerson et al., 2004).

### 3.2.2.2 Exposition aux PM<sub>2,5</sub> et risques pulmonaires.

Les conséquences liées à des expositions à long terme aux particules ambiantes sont également importantes au niveau pulmonaire avec l'apparition de pathologies telles que l'asthme, des bronchites chroniques ou encore des BPCO (Sunyer., 2001 ; Ling and van Eeden., 2009, Faustini et al, 2012). Les BPCO sont caractérisées par la limitation persistante du flux d'air associée à une réponse inflammatoire chronique renforcée suite à l'exposition à des particules ou des gaz nocifs dans les voies respiratoires (GOLD., 2015). La prévalence de la pathologie est importante et atteint plus de 210 millions de cas dans le monde (Soriano and Lamprecht., 2012). Les symptômes associés à l'exacerbation des BPCO sont une augmentation de la toux, des dyspnées ou encore des expectorations purulentes qui entraînent une réduction importante des fonctions respiratoires (McGuire et al., 2001). Selon un rapport publié par le ministère de la santé et des solidarités, 3,5 millions de personnes sont atteintes de BPCO en France et 16 000 personnes en décèdent par an. La prévalence de ces symptômes peut être associée à une cause infectieuse ou non infectieuse. La cause infectieuse qui reste la plus courante met en avant la présence de bactéries et de virus tels que *Streptococcus pneumoniae*



ou des rhinovirus (Perotin et al., 2013). Les facteurs non infectieux sont principalement liés à la pollution atmosphérique, en effet, il est montré que l'exposition aux  $PM_{2.5}$  est associée à l'exacerbation des BPCO et favorise donc la morbidité et mortalité liées à ces pathologies (Dominici et al., 2003 ; Laden et al., 2006 ; Sint et al., 2008). Ainsi, une augmentation de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $PM_{2.5}$  est associée à une augmentation de 2,5% de la mortalité liée au BPCO dans le monde (Li et al., 2015). Comme décrit précédemment dans le chapitre (2.3.2.2), les particules fines peuvent pénétrer jusqu'aux régions alvéolaires où la partie insoluble peut venir s'accumuler et favoriser l'obstruction du flux d'air (Ling and van Eeden., 2009 ; Brook et al., 2010). Chez les patients BPCO, qui présentent une architecture pulmonaire différente des sujets sains et des mécanismes de clairance affectés, la déposition pulmonaire des particules fines et leur temps de résidence sont plus importants (Ling and van Eeden., 2009). Les  $PM_{2.5}$  vont favoriser le stress oxydatif et l'inflammation à la fois au niveau local et systémique ce qui va profondément affecter les capacités respiratoires et le système immunitaire des patients et contribuer à l'aggravation des symptômes des patients BPCO.

L'asthme est un réel enjeu de santé publique puisque 300 millions de personnes sont affectées par cette maladie à travers le monde parmi lesquelles, 250 000 personnes par an en décèdent et 4 millions de personnes affectées en France avec 2000 décès par an. Elle est caractérisée par une hyperréactivité bronchique, une obstruction bronchique, une sécrétion plus importante de mucus et une inflammation chronique, ces symptômes à la différence des BPCO peuvent être réversibles (Masoli et al., 2004 ; WHO., 2007). De plus, cette pathologie est fortement présente chez l'enfant où des symptômes asthmatiques sont retrouvés dans 11,6% des enfants de 6-7 ans dans le monde (Pearce et al., 1998). La prévalence de l'asthme est en constante augmentation depuis la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle ceci s'expliquant par l'urbanisation importante de la population. De manière inquiétante, l'augmentation à venir du nombre d'asthmatiques est estimée à 100 millions en plus d'ici à 2025 (WHO., 2007 ; To et al., 2012). L'exposition aux PM et particulièrement aux  $PM_{2.5}$  est clairement associée à une augmentation de la mortalité liée à l'asthme ainsi qu'une augmentation de l'incidence et de l'exacerbation de cette pathologie à la fois chez l'adulte et l'enfant (Koren et al., 1995 ; Norris et al., 1999 ; Schwartz and Neas., 2000 ; Halonen et al., 2008).

### 3.2.2.3 Exposition aux PM<sub>2,5</sub> et cancers.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde et est responsable de 8,2 millions de décès en 2012 (CIRC., 2014). Parmi ces cancers, le cancer du poumon reste l'un des cancers les plus fréquents avec 1,61 millions de nouveaux cas en 2008 dans le monde (CIRC, 2010) et 39 495 nouveaux cas estimés en 2012, en France (INCA). Le tabagisme reste le facteur de risque le plus important associé à la cancérogenèse pulmonaire et est à l'origine de 83 à 92% des cancers du poumon chez les hommes, et 57 à 80 % chez les femmes (CIRC., 2010). Même si le tabac reste de loin le premier facteur de risque dans l'oncogénèse pulmonaire, plusieurs autres cancérogènes environnementaux ou professionnels tels que l'amiante, des métaux (As, Cd, Cr, Ni, Si) ou les HAP sont également impliqués dans l'apparition des cancers bronchopulmonaires (Alberg et al., 2007).

De nombreuses études épidémiologiques, à travers le monde, associent l'augmentation de la prévalence des cancers pulmonaires avec l'exposition aux PM (Cohen et al., 2000 ; Pope et al., 2002 ; Bellen et al., 2008 ; Brunekreef et al., 2009 ; Kantanoda et al., 2011 ; Turner et al., 2011) et récemment la pollution atmosphérique a été classée, par le CIRC, comme cancérogène avéré pour l'homme (Loomis et al., 2013). Une méta-analyse réalisée en Europe sur 17 cohortes et qui comprend environ 300 000 personnes démontre une forte association entre l'exposition aux particules et l'augmentation de la survenue de cancers pulmonaires notamment des adénocarcinomes. De plus, 12.8% des décès liés aux cancers pulmonaires seraient imputables à l'exposition aux particules fines (Evans et al., 2013 ; Fajersztajn et al., 2013). Cependant, il est probable que ces différents chiffres soient sous-estimés puisque la majorité des études à long terme sont réalisées dans des villes où les concentrations moyennes en PM<sub>2,5</sub> sont situées entre 5 et 35 µg/m<sup>3</sup> alors que des grandes villes chinoises ou indiennes voient des concentrations moyennes en particules fines aux alentours des 100 µg/m<sup>3</sup> (Fajersztajn et al., 2013 ; WMO/IGAC., 2012).

La composition des particules joue un rôle important dans le processus de cancérisation initié par les particules. En effet, le carbone élémentaire et les hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans les particules favorise la cancérogenèse (Garshick et al., 2012 ; Yuan et al., 2014). Une étude de 2016 a montré une corrélation entre la composition en S et Ni des particules et l'apparition de cancers pulmonaires (Raaschou-Nielsen et al., 2016). L'identification de biomarqueurs d'exposition chez l'homme tend à s'intensifier afin d'appuyer les études épidémiologiques. Les adduits à l'ADN sont particulièrement étudiés et peuvent être

le reflet d'une exposition à des composés aromatiques dont les HAP. En effet, une étude Danoise a mesuré l'oxydation de l'ADN (8OHdG) dans des lymphocytes de 50 étudiants exposés de manière environnementale à des particules fines. Les résultats ont montré une augmentation de 11% de la 8OHdG à chaque augmentation de  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  de particules (Sorensen et al., 2003) sachant qu'une augmentation de dommages à l'ADN peut favoriser la cancérogenèse. Une autre étude réalisée à Prague effectue le même constat et montre une augmentation des adduits à l'ADN en lien avec l'exposition aux HAP présents dans l'air notamment sur les particules fines (Topinka et al., 2007).

**Les études épidémiologiques montrent donc de manière évidente le lien étroit entre l'exposition aux particules et des effets sur la mortalité et la morbidité. En plus de présenter des effets au niveau cardiovasculaire, les particules fines sont également impliquées au niveau pulmonaire où la prévalence de pathologies telles que la BPCO, l'asthme ou encore les cancers pulmonaires est augmentée. Très récemment, les particules fines ont été classées cancérogène avéré pour l'homme. Cependant, il est difficile au vu de la variabilité de la composition des particules de mettre en avant un ou des marqueurs d'exposition à ces mêmes particules. Des études toxicologiques fines sont donc nécessaires pour venir compléter les différentes études épidémiologiques et ainsi permettre de mieux établir le lien entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et l'apparition des cancers pulmonaires.**

### 3.3 Toxicologie des particules fines.

Plusieurs approches sont classiquement utilisées dont des études humaines en milieu contrôlé, des études d'exposition *in vivo* ou des études *in vitro*. Ces différentes approches montrent des avantages et des limites mais restent complémentaires et nécessaires à la meilleure compréhension de l'impact sanitaire des PM.

Suite à leur inhalation et leur déposition à la surface des bronches et des alvéoles pulmonaires, les PM<sub>2.5</sub> sont internalisées dans les cellules épithéliales ou phagocytées par les macrophages alvéolaires (Gualtieri et al., 2011). Par conséquent, les particules fines sont capables d'induire de nombreuses réponses cellulaires telles que le stress oxydatif ou l'inflammation qui seraient la cause d'un grand nombre de leurs effets ; d'autres effets, génotoxiques ou de modifications du cycle cellulaire, sont également décrits (Abbas et al., 2009, 2010, 2013, 2016 ; Billet et al., 2007, 2008 ; Dagher et al., 2005, 2006, 2007 ; Dergham et al., 2012, 2015 ; Huang et al., 2013 ; Li et al., 2006 ; Saint-Georges et al., 2008, 2009). Plus

récemment, des modifications génétiques ou épigénétiques, c'est-à-dire des changements qui n'influent pas la séquence codante du génome mais peuvent affecter l'expression des gènes, ont été montrées comme étant impliquées dans l'influence néfaste de la pollution atmosphérique particulaire sur la fonction respiratoire des sujets sains et des sujets présentant un état pathologique chronique, tels que des BPCO ou de l'asthme, voire un état cancéreux. (Mitchell et al., 2008 ; Hanahan and Weinberg., 2011 ; Herceg and Vaissière., 2011 ; Jardim., 2011 ; Prescott et al., 2012). Cependant, ces mécanismes restent actuellement peu décrits, d'où la nécessité de développer des approches pluridisciplinaires combinant des études physico-chimiques avec des études toxicologiques, utilisant des modèles innovants pour accroître la connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leurs effets délétères sur la santé et notamment dans la cancérogenèse pulmonaire.

### 3.3.1 Différents modèles cellulaires et méthodologies utilisés pour la toxicologie des PM<sub>2.5</sub>.

#### 3.3.1.1 Etudes humaines en milieu contrôlé

Ces études, complémentaires des études épidémiologiques, permettent d'étudier les conditions d'exposition dans des conditions contrôlées afin établir des relations de cause à effet et également de minimiser l'effet des facteurs confondants (Devlin et al., 2005). Les avantages de ces études reposent sur le choix des sujets qui le sont en fonction de l'âge, du sexe, de leur statut pathologique, de leur lieu de résidence, etc. Cependant, pour des raisons éthiques évidentes, les expositions sont restreintes en terme de concentration et de temps d'exposition, les études d'exposition aiguës et à long terme ne peuvent donc pas être réalisées. De plus, elles restent très coûteuses et ne prennent qu'un petit nombre de sujets. Par conséquent, les réponses obtenues restent transitoires et posent la question du reflet par rapport à une exposition réaliste (Utell and Frampton., 2000).

Concernant les conditions d'exposition, elles peuvent être réalisées en chambre d'exposition afin d'avoir une exposition complète ou peuvent également être appliquées au nez ou à la bouche, seuls ou aux deux en même temps. Les expositions sont très courtes, de l'ordre de 2h, et les techniques d'analyse doivent être non invasives (Utell and Frampton., 2000). Les points qui sont analysés concernent généralement des troubles respiratoires ou cardiovasculaires. Des tests spirométriques permettent d'évaluer le statut respiratoire et des paramètres tels que la capacité vitale forcée (CVF) qui correspond au volume maximum d'air

expulsé au cours d'une expiration, le Volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) ou encore le débit expiratoire de pointe (DEP) qui permet d'obtenir le débit le plus élevé lors d'une expiration maximale le plus rapidement possible et après une profonde inspiration (Ghio et al., 2000). Pour l'analyse des fluides bronchiques l'expectoration forcée est classiquement utilisée (Becket et al., 2005). Cependant pour une étude plus approfondie des fluides mais également des cellules épithéliales, une méthode plus invasive telle que la fibroscopie bronchique est réalisée (Utell and Frampton., 2000). Les lavages bronchoalvéolaires permettent de récupérer les fluides et les cellules épithéliales situées dans le poumon profond. En plus des expectorats et des cellules épithéliales, du sang peut être prélevé pour effectuer un comptage des cellules sanguines, évaluer des paramètres inflammatoires ou de stress oxydatif ou encore mesurer la présence d'éventuelles altérations génétiques (Ghio et al., 2000 ; Dubowsky et al., 2006).

### 3.3.1.2 Modèles *in vivo*

Les expositions chez l'animal peuvent compenser les différentes limitations précédemment décrites, à savoir que des études de toxicologie aiguë et des études d'exposition à long terme peuvent être réalisées dans ces modèles. L'avantage de l'utilisation de ces animaux est qu'ils présentent une homogénéité génétique comparée aux sujets des études humaines en milieu contrôlé. Cependant, les conditions d'exposition ainsi que les concentrations de PM à utiliser doivent être optimisées pour se rapprocher des conditions d'exposition chez l'homme. De plus, de grandes différences subsistent entre les modèles animaux et l'homme qu'elles soient dans le style de vie, l'alimentation ou encore liées aux variabilités génétiques ou anatomiques (Valentine and Kennedy., 2014). La déposition des particules dans les différentes régions du tractus respiratoire peut dépendre des caractéristiques de l'aérosol, des méthodes d'exposition, du statut respiratoire ou encore de la morphologie du tractus respiratoire (Méndes et al., 2010). En effet, la structure du poumon chez la souris est différente de celle de l'homme puisqu'elle est uniquement composée de conduits et sacs alvéolaires et ne contient pas de bronchioles (Phalen et al., 1978 ; Thiesse et al., 2010). De plus, les poumons de souris présentent un branchement asymétrique au contraire de l'homme dont la géométrie est davantage symétrique (Winkler-Heil and Hofmann., 2016). Par conséquent, les mécanismes de clairance pulmonaire, d'endocytose cellulaire ou de pénétrance pulmonaire des particules peuvent être différents et donc les effets des particules peuvent être sur ou sous estimés. De plus, il est important de considérer que les mécanismes qui se mettent en place suite à l'exposition aux PM peuvent être sensiblement différents dans les différentes espèces.

Les modèles les plus utilisés sont les rongeurs et particulièrement les rats et les souris. Les souris sont particulièrement utilisées pour des expositions chroniques ou encore des effets carcinogènes. En effet, un nombre important de souris transgéniques sont disponibles, notamment des modèles knockout et knockin dans lesquels des gènes sont mutés, invalidés ou au contraire surexprimés. Ces modèles sont préférablement utilisés en cancérologie où des gènes dits oncogènes comme le gène *kras* sont surexprimés et des gènes dits suppresseurs de tumeur comme le gène *tP53* sont mutés ou invalidés sur un des allèles ou complètement (Dutt and Wong., 2006). Les souris BALBc sont classiquement utilisées dans les études de toxicologie des particules surtout dans les études liées au cancer puisqu'elles présentent une sensibilité moyenne aux carcinogènes (Meuwissen and Berns., 2005 ; Kleinman et al., 2007 ; Sancini et al., 2014)

De la même manière que pour les études humaines en milieu contrôlé, les animaux sont exposés aux particules dans des chambres d'exposition ou par une exposition directe par le nez et/ou la bouche. Les expositions peuvent aussi être réalisées sous forme d'instillations intranasales ou intratrachéales où les particules sont reprises dans un milieu salin avant d'être instillées (Suwa et al., 2002 ; Ulrich et al., 2002). Sur les animaux exposés, des signes cliniques peuvent être étudiés, des prélèvements tels que le liquide bronchoalvéolaire, le sang ou encore des prélèvements d'organes en vue d'études histopathologiques ou analytiques peuvent être effectués (génomiques ou protéomiques) (Saldiva et al., 2008).

### 3.3.1.3 Modèles *in vitro*

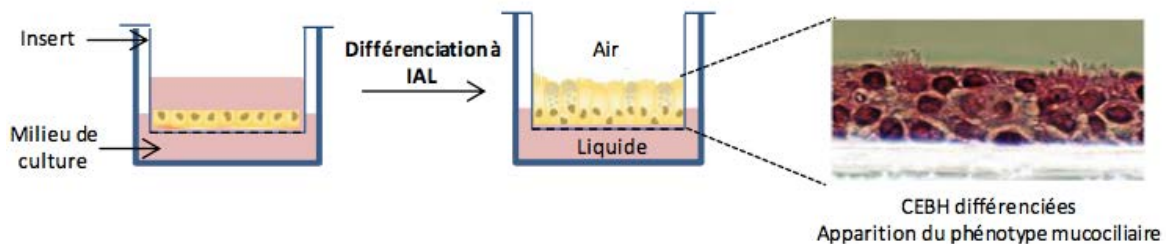
De nombreux modèles *in vitro* de culture de cellules pulmonaires sont utilisés pour étudier les effets de la pollution particulaire sur la santé. Ces modèles qui m'intéressent tout particulièrement dans mon étude, présentent de nombreux avantages dont la possibilité d'étudier de manière fine des mécanismes cellulaires et moléculaires (Rothen-Rutishauser et al., 2008). Des lignées cellulaires pulmonaires sont particulièrement utilisées pour les études de toxicologie particulaire. Ce sont des cellules dites immortelles, car cancéreuses, qui de par leur prolifération active, peuvent être maintenues en culture indéfiniment. C'est le cas des A549 qui sont des cellules humaines d'adénocarcinome alvéolaire, ou rendues immortelles par des procédés biotechnologiques, ce sont donc des lignées cellulaires pulmonaires saines, telles que les BEAS2B, les Calu-3 ou les 16HBE14o- (Mitschik et al., 2008). Cependant, des limitations émanent de l'utilisation de ces modèles. En effet, l'utilisation de lignées cellulaires et surtout de lignées cancéreuses soulève des problématiques, puisque ces cellules, issues d'une tumeur

primaire, conservent leurs caractéristiques tumorales telles qu'une prolifération active, une résistance à la mort cellulaire programmée ou apoptose ou encore une forte capacité à promouvoir l'inflammation (Wistuba et al., 1999 ; Hanahan and Weinberg., 2011). De plus, une étude comparative des profils d'expression génique a été réalisée à la fois dans les cellules CEBH et dans des cellules cancéreuses pulmonaires et révèle d'importantes différences d'expression de gènes. En effet, la diminution de l'expression de certains inhibiteurs chargés de réguler le cycle cellulaire et par conséquent de contrôler la prolifération des cellules ainsi que la surexpression de gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires, sont observées dans la plupart des lignées cancéreuses pulmonaires étudiées (Hellmann et al., 2001). De même, les lignées cellulaires issues de patients sains, notamment les BEAS2B, sont immortalisées afin d'obtenir des cellules capables de se multiplier de nombreuses fois *in vitro*, ces cellules vont donc également acquérir des caractéristiques prolifératives très actives. Ces différents types cellulaires s'éloignent de la réalité *in vivo*, il est donc difficile d'extrapoler des mécanismes cellulaires d'exposition aux particules dans des cellules exacerbées.

L'utilisation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) se développe. Ces cellules bronchiques sont directement prélevées chez le patient et ne sont pas immortalisées, elles prolifèrent très peu et sont donc soumises au vieillissement cellulaire. Cependant, ces cellules présentent l'avantage de se rapprocher de la réalité. Toutefois, peu d'études différencient les CEBH à l'Interface Air/Liquide (IAL). Les CEBH cultivées et différenciées à l'IAL ont leur face apicale en contact avec l'air et sont capables de reconstituer un épithélium pseudostratifié composé de cellules polarisées possédant un phénotype mucociliaire (Gray et al., 1996 ; Ross et al., 2007) (Fig.18). De plus, ce modèle permet de maintenir les phénotypes pathologiques de cellules issues de patients atteints de BPCO ou d'Asthme (Davies et al., 2009 ; Kesimer et al., 2009 ; Burgel et al., 2011 ; Freihsat et al., 2011 ; Regamey et al., 2011). Des études du profil génétique des CEBH cultivées à l'IAL ont permis de montrer que ces cellules présentent des similarités de profil d'expression génique avec les cellules pulmonaires humaines directement prélevées chez le patient, laissant penser qu'il est important de les différencier à l'IAL à la fois pour la reconstitution de l'épithélium mais également pour retrouver des caractéristiques géniques proches des cellules *in vivo* (Pezzulo et al., 2011). De façon générale, les cultures primaires différenciées à l'IAL représentent un modèle très proche de l'épithélium bronchique humain. De plus, des études protéomiques récentes réalisées sur des sécrétions de cellules NHBE en culture et sur des sécrétions pulmonaires humaines montrent une identité tant au niveau des protéines retrouvées

que dans les quantités mesurées (Kesimer et al. 2009). Cependant, quelques différences sont mesurées, notamment une augmentation de l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire observée dans les cellules cultivées à l'IAL alors qu'une expression plus importante des gènes impliqués dans la réponse immunitaire est mesurée dans les cellules analysées directement après leur prélèvement chez le patient (Dvorak et al., 2011). Une étude réalisée par Ghio et ses collaborateurs montre que la différenciation des cellules à l'IAL est associée avec une réponse biologique aux PM qui est diminuée. Les auteurs justifient cette diminution de réponse par la présence plus importante d'oxygène dans les cultures à l'IAL, en effet, l'hypoxie semble potentialiser l'inflammation dans ces mêmes cellules (Ghio et al., 2013).

Des études plus récentes se focalisent sur le développement de nouveaux modèles de culture cellulaire qui tendent à se rapprocher le plus possible des conditions humaines. Bérubé et ses collaborateurs décrivent l'utilisation d'un modèle de culture organotypique bronchique (Bérubé et al., 2010). L'utilisation de ce modèle en co-culture avec d'autres types cellulaires tels que des cellules endothéliales ou des fibroblastes pourrait être intéressante pour venir compléter les résultats de toxicologie des PM déjà décrits dans la littérature.



**Fig.18** : Schéma de la culture des CEBH à l'interface air liquide (IAL). Les cellules sont ensemencées dans un insert et cultivées dans leur milieu jusqu'à confluence. Elles sont ensuite différenciées à l'IAL dans un milieu de culture spécifique. Après quelques semaines, les cellules ont reconstitué un épithélium pseudostratifié composé de cellules polarisées possédant un phénotype mucociliaire.

Différentes méthodologies d'exposition sont utilisées dont l'exposition en milieu liquide où les particules sont reprises dans du milieu de culture cellulaire ou dans un tampon salin. Cependant, l'utilisation de cette méthode peut sensiblement changer la composition ou les caractéristiques de surface des particules (Bruijne et al., 2009). Cependant, même si la distribution des particules est difficile à appréhender, cette méthode reste facile et peu coûteuse et la quantité de particules déposées reste constante. Des chambres d'exposition sont également utilisées pour exposer les cellules qui devront être différenciées à l'IAL aux PM. Ces chambres nécessitent l'utilisation d'une quantité importante de particules. Cependant, un système récent, le système ALICE, permet d'exposer les cellules, à des doses contrôlées, à un aérosol de



particules. Cet appareil permet de déposer les particules de manière uniforme et reproductible et ne nécessite pas l'utilisation trop importante de particules (Lenz et al., 2009). Dans les études *in vitro* de toxicologie des particules, différents paramètres sont classiquement étudiés dont la cytotoxicité, le stress oxydatif, l'inflammation, les dommages à l'ADN ou encore des mécanismes tels que l'apoptose.

### 3.3.2 Principaux mécanismes décrits dans la toxicologie des PM

#### 3.3.2.1 L'inflammation

L'inflammation est une réaction clé impliquée dans la défense de l'organisme face aux agents pathogènes. Cependant, cette inflammation peut persister, devenir intense et conduire au développement de pathologies telles que l'asthme ou les BPCO (Chung and Adcock., 2008). Au cours de l'inflammation pulmonaire, des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires sont sécrétés par les macrophages alvéolaires qui sont des cellules immunitaires résidant dans les alvéoles pulmonaires, et également par les cellules épithéliales pulmonaires elles-mêmes. Parmi les médiateurs favorisant l'inflammation sont retrouvées des cytokines qui sont des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, sécrétées suite à une lésion et capables d'agir à distance sur d'autres cellules et de réguler leur activité. A noter que certaines cytokines ont au contraire un rôle dans le processus anti-inflammatoire.

L'inflammation est impliquée dans la plupart des effets néfastes induits suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub>. En effet, suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub>, les macrophages alvéolaires et l'épithélium pulmonaire vont contribuer au phénotype inflammatoire en produisant des cytokines et chimiokines parmi lesquelles sont retrouvés le *Tumor Necrosis Factor* (TNF $\alpha$ ), ou encore les InterLeukines (l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou l'IL-8) (Dergham et al., 2012 ; Dieme et al., 2012). L'IL-1 $\beta$  est surexprimée dans les poumons de patients atteints de BPCO et joue un rôle important dans la pathogenèse en favorisant l'obstruction bronchique et la surproduction de mucus (Lappalainen et al., 2005). Le TNF $\alpha$  sécrété par les macrophages alvéolaires va stimuler la réponse inflammatoire induite par les cellules épithéliales et favoriser la sécrétion de cytokines impliquées dans le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires (Imrich et al., 1999). Le TNF $\alpha$  est également retrouvé surexprimé dans les poumons de patients atteints de BPCO (Keatings et al., 1996). L'IL-8, quant à elle, est rapidement sécrétée à la suite d'une lésion et notamment chez les patients atteints de BPCO et voit sa sécrétion régulée par l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (Nocker et al., 1996, Pease et al., 2002). L'IL-6 va favoriser le recrutement de

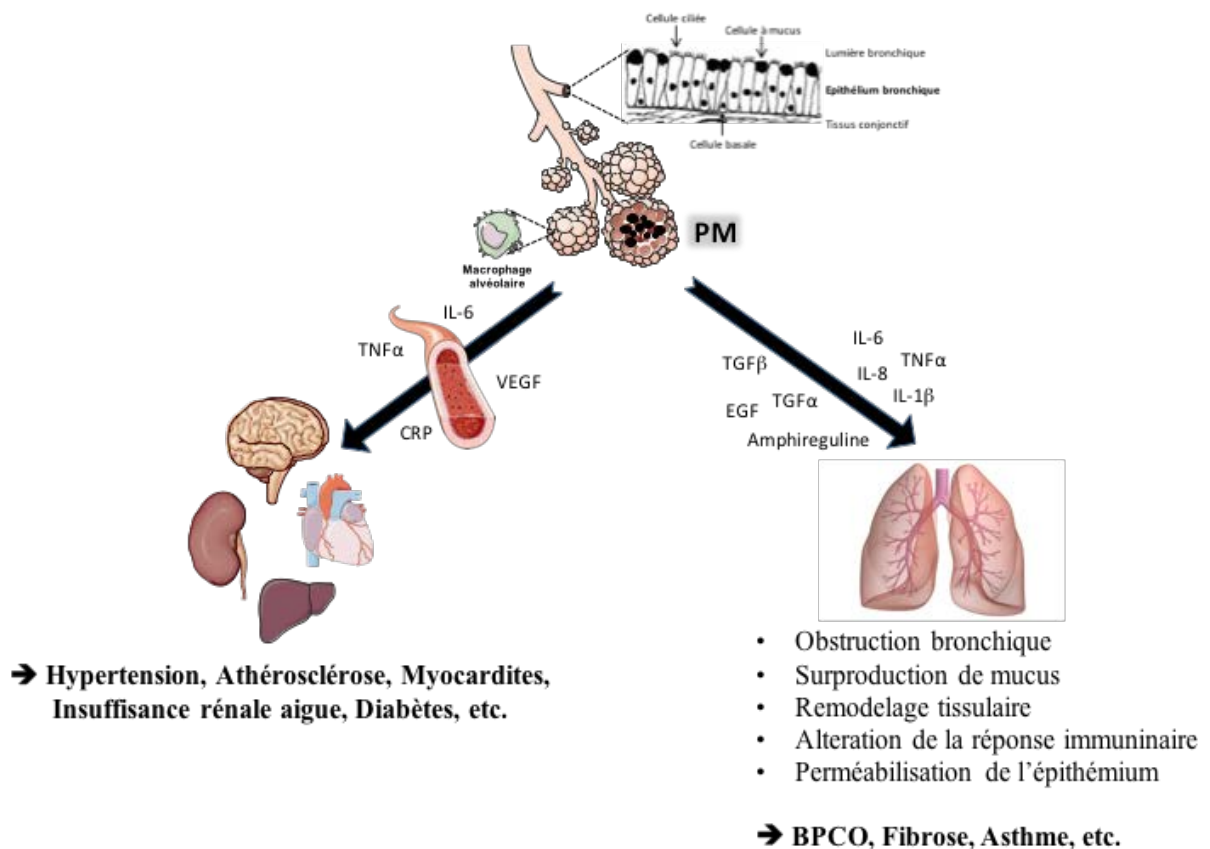
cellules immunitaires telles que les lymphocytes (Bacon et al., 1990). De plus, les cellules immunitaires et épithéliales vont favoriser la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), l'Amphireguline, les *Transforming Growth Factor* (TGF $\alpha$  ou le TGF $\beta$ ) qui sont impliqués dans des réponses pro inflammatoires ainsi que dans la réparation cellulaire (Rumelhard et al., 2007 ; Dysart et al., 2014). Ces différentes sécrétions contribuent au remodelage tissulaire favorisant l'épaississement de l'épithélium bronchique ainsi que la fibrose pulmonaire (Rumelhard et al., 2007 ; Dysart et al., 2014 ; Zaiss et al., 2015). Par exemple, le TGF $\alpha$  a un effet pro-inflammatoire et favorise la fibrose pulmonaire et contribue donc à l'obstruction des bronches (Madtes et al., 1999).

Des études *in vivo* montrent, en plus de l'inflammation locale, un lien entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et une inflammation systémique. L'inflammation locale a été montrée à la fois chez l'homme et les animaux exposés aux PM<sub>2.5</sub> où, de même que dans les études *in vitro*, une augmentation d'IL-6 et de TNF $\alpha$  a été mesurée dans des lavages bronchoalvéolaires de souris exposées aux PM<sub>2.5</sub> (Riva et al., 2011 ; Wang et al., 2013 ; Xu et al., 2013 ; Zhao et al., 2014). L'exposition aux particules fines est associée à la fois chez l'homme et l'animal à l'augmentation dans le sang de l'IL-6 et du TNF $\alpha$  mais également de la C-Reactive Protein (CRP) et du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ce qui va favoriser les réponses inflammatoires dans des organes périphériques tels que le foie, le cœur, les reins, ou le cerveau. La sécrétion de ces cytokines dans ces différents organes va donc favoriser l'augmentation de la pression artérielle, l'athérosclérose, les myocardites, l'insuffisance rénale aiguë ou encore les diabètes (Xu et al., 2008 ; Pearson et al., 2010 ; Xie et al., 2013 ; Zhao et al., 2013 ; Ying et al., 2014 ; Mehta et al., 2016). L'inflammation peut également s'expliquer par les interconnexions qui existent entre le récepteur AHR et le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. AHR joue un rôle central dans la détoxification cellulaire par l'activation notamment des enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques et permet de métaboliser des toxiques tels que les HAP (paragraphe 3.3.2.6). NF- $\kappa$ B est impliqué dans la réponse immunitaire et les réponses liées au stress cellulaire. Le lien entre NF- $\kappa$ B et AHR est assez controversé puisque certaines études décrivent un effet pro-inflammatoire de l'AHR et d'autres montrent un effet plutôt anti-inflammatoire (Øvrevik et al., 2014).

De plus, les PM<sub>2.5</sub> peuvent altérer la réponse immunitaire pulmonaire et favoriser les infections. En effet, le boost inflammatoire produit suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> peut entraîner la mort cellulaire à la fois des cellules épithéliales ou des fibroblastes ce qui a pour conséquence d'augmenter la perméabilité de la barrière épithéliale qui ne jouera plus son rôle de protection

physique vis à vis des agents extérieurs (Gualtieri et al., 2011 ; Huang et al., 2013). L'exposition aux  $PM_{2.5}$  va également défavoriser la phagocytose des agents microbiens par les macrophages alvéolaires (Doherty et al., 2007 ; Zhao et al., 2014) (Fig.19).

La composition et la taille des particules peuvent avoir une influence sur la variation des réponses inflammatoires (Becker et al., 2003). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que la réponse inflammatoire est plus importante suite à l'exposition aux  $PM_{10}$  comparée aux  $PM_{2.5}$ . Ceci étant probablement lié à la composition en micro-organismes et donc à la présence d'endotoxines, comme le LipoPolySaccharide (LPS), majoritairement retrouvées dans la fraction grossière des particules (Monn et al., 1999 ; Huang et al., 2002 ; Schins et al., 2004). Certains métaux de transition dont le Fe ou le Cu sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire dû à leur implication dans les réactions de fenton, décrites dans le paragraphe 3.3.2.2 (Aust et al., 2002).

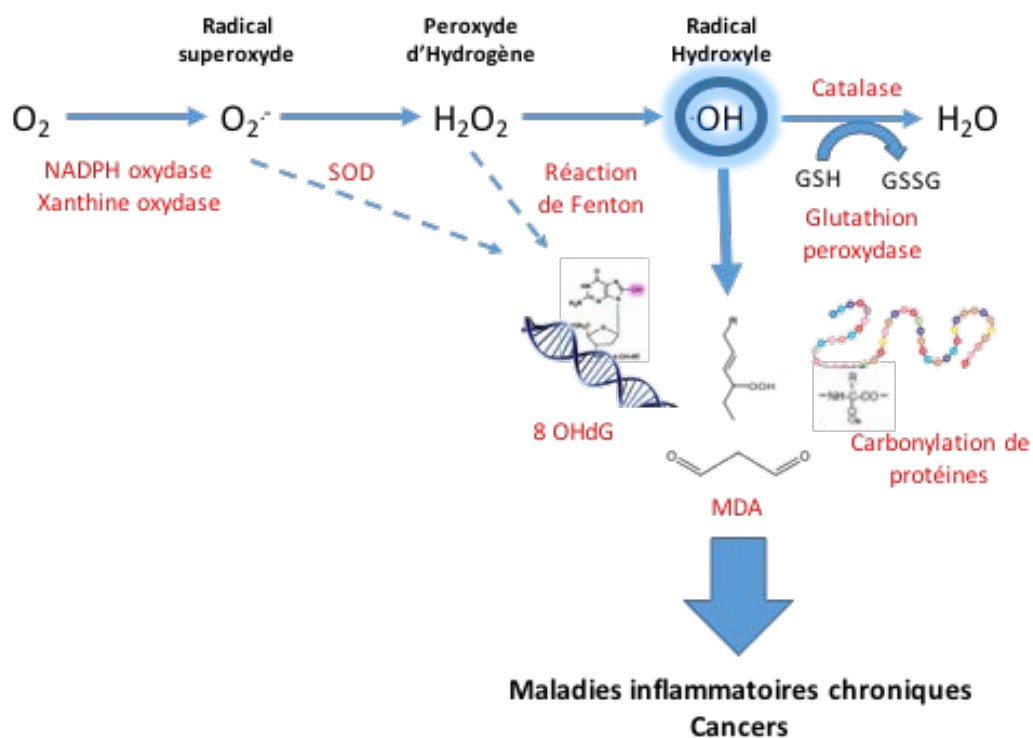


**Fig.19 : L'exposition aux particules favorise l'inflammation.** Suite à l'exposition aux  $PM_{2.5}$ , les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages alvéolaires vont produire des médiateurs inflammatoires tels que des cytokines (*Tumor Necrosis Factor* (TNF $\alpha$ ), ou InterLeukines (l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 ou l'IL-8), des facteurs de croissance (*Epidermal Growth Factor* (EGF), Amphireguline, *Transforming Growth Factor* (TGF $\alpha$  ou le TGF $\beta$ ) ou la protéine CRP. Ces médiateurs vont intervenir au niveau local et favoriser l'apparition de pathologies telles que les BPCO, la fibrose ou encore l'asthme. Ils vont être sécrétés dans la circulation sanguine et atteindre des organes tels que le coeur, le cerveau, le foie ou les reins où ils vont être à l'origine ou potentialiser l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, les myocarditis, l'insuffisance rénale aigue ou encore les diabètes.

### 3.3.2.2 Le stress oxydatif.

L'oxygène est indispensable au bon fonctionnement des cellules, cependant, des dérivés cytotoxiques de l'oxygène sont continuellement générés à partir des membranes cellulaires, du cytoplasme, des vacuoles (NADPH oxydase) ou encore des mitochondries (phosphorylation oxydative) (Barouki et al., 2001). Ces dérivés de l'oxygène ou Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) constituent des entités chimiques certes réactives, mais indispensables au métabolisme des êtres vivants. En effet, dans les conditions normales, elles jouent un rôle important dans les mécanismes de défense face aux agents infectieux ou encore dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires et ce, à de faibles concentrations (Hensley et al., 2000). Pour pallier leur caractère nocif, la cellule contrôle leur concentration grâce à un panel de molécules piègeuses, telles que les antioxydants ou encore grâce à des mécanismes cellulaires de réparation des dommages causés à l'ADN, aux protéines ou aux lipides. Dans les conditions normales, la balance entre les prooxydants et les antioxydants est à l'équilibre, cependant, dans certaines pathologies la balance est déséquilibrée en faveur de la production d'ERO. D'un point de vue mécanistique, le dioxygène peut capter un électron pour former le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Ce radical est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène par la SuperOxyde Dismutase (SOD) qui en présence de métaux tels que le fer ou le cuivre peut donner un radical hydroxyle  $\cdot OH$  par les réactions de Fenton. Le radical hydroxyle, l'espèce radicalaire la plus réactive, peut être detoxifiée par la catalase ou la glutathion peroxydase et former une molécule d'eau (Fig.20). Le glutathion, sous sa forme réduite (GSH), est un antioxydant majeur qui participe à la détoxification des ERO (Masella et al., 2005). Néanmoins, en réponse à un stress cellulaire très important, ces systèmes de régulation peuvent être altérés ou saturés par une surproduction massive d'ERO et/ou un effondrement des défenses antioxydantes endogènes. Le stress oxydatif qui en résulte est alors capable de générer des dommages cellulaires et de favoriser l'apparition de certaines pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques ou encore le cancer. (Dreher et al., 1996 ; Marnett et al., 2000). Parmi les ERO, le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) est sans conteste l'espèce la plus réactive et est capable de réagir avec l'ensemble des macromolécules cellulaires, notamment avec les lipides, les protéines et l'ADN. Le radical  $\cdot OH$  est impliqué dans la peroxydation lipidique qui va entraîner une altération des lipides qui constituent la membrane plasmique cellulaire et également la formation de dérivés lipidiques tels que le Malondialdéhyde (MDA) qui lui-même est toxique car capable de se fixer de manière covalente avec certains groupements spécifiques de l'ADN et/ou des protéines (Marnett et al., 1999). Ainsi, la détermination du MDA dans des conditions pathologiques a été décrite comme

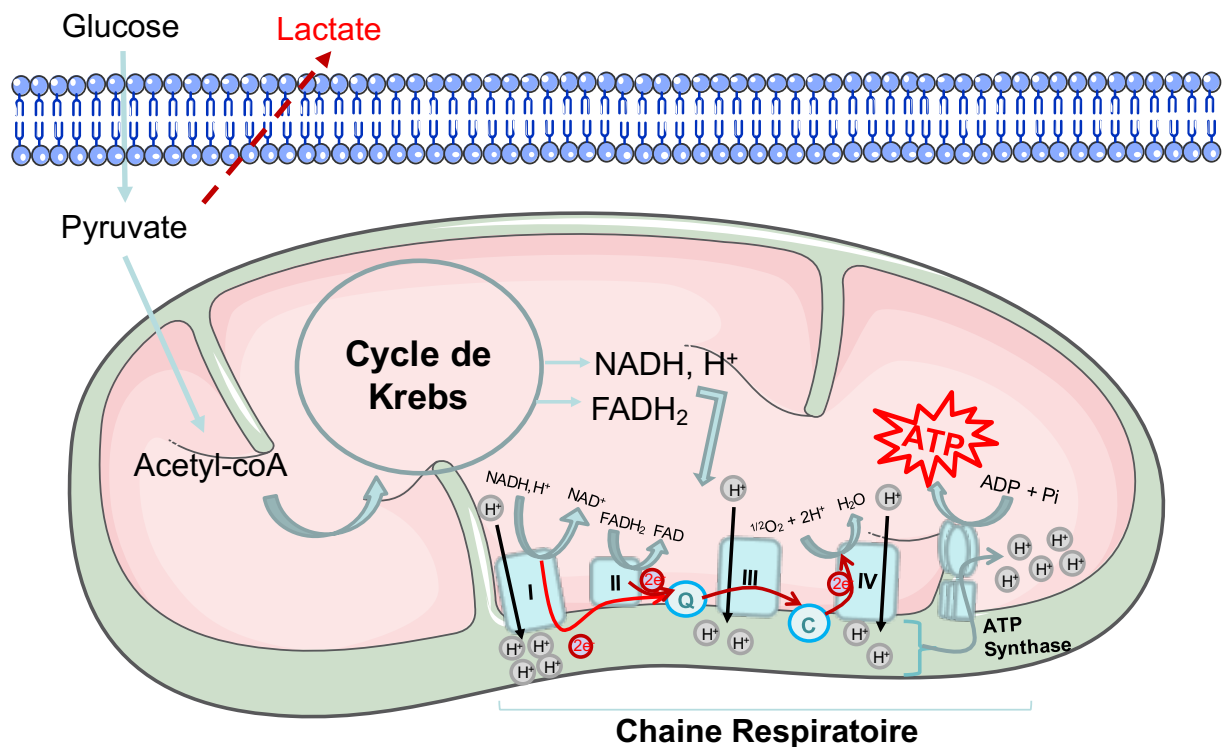
un marqueur biologique des altérations membranaires induites par la peroxydation lipidique. Les protéines sont également oxydées par les ERO ce qui entraîne l'altération de leurs chaînes d'acides aminés favorisant le clivage des protéines et donc la perte de leurs fonctions. La carbonylation des protéines en est le meilleur exemple, puisque les protéines carbonylées sont des marqueurs biologiques de l'altération des protéines dans des conditions de stress oxydatif (Dalle-Donne et al., 2003). Les dommages à l'ADN induits par les ERO recouvrent plusieurs aspects dont l'hydroxylation des nucléotides composant l'ADN, dont la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), ou encore des cassures de l'ADN. La désoxyguanosine, l'un des quatre nucléotides composant l'ADN, est sensible à l'action du radical hydroxyle. La liaison covalente de ce radical à la désoxyguanosine forme la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur biologique spécifique du stress oxydatif et de ses effets délétères au niveau des nucléotides (Grollman et al., 1993) (Fig.20).



**Fig.20** : Formation des espèces réactives de l'oxygène. Le dioxygène peut capter un électron pour former le radical superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Ce radical est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la SuperOxyde Dismutase (SOD) qui en présence de métaux tels que le fer ou le cuivre peut donner un radical hydroxyle  $\cdot OH$  par les réactions de Fenton. Le radical hydroxyle, l'espèce radicalaire la plus réactive, peut être detoxifiée par la catalase ou la glutathion peroxydase et former une molécule d'eau ( $H_2O$ ). Le radical hydroxyle et dans une moindre mesure le radical superoxyde et l' $H_2O_2$  sont impliqués dans la peroxydation lipidique qui peut former des dérivés tels que le Malondialdéhyde (MDA), dans l'oxydation de bases de l'ADN avec la formation de 8 OHdG et dans la carbonylation de protéines. Toutes ces altérations vont favoriser l'apparition de pathologies dont des maladies inflammatoires chroniques ou des cancers.

### 3.3.2.3 Rôle des mitochondries dans la respiration cellulaire et le stress oxydatif

L'oxygène est indispensable à la production d'énergie sous forme d'Adenosine TriPhosphate (ATP), cette production d'énergie se fait dans la mitochondrie et ce grâce à la chaîne respiratoire. En condition aérobie, les cellules normales vont convertir le glucose en pyruvate dans le cytosol par la glycolyse. Ce pyruvate est ensuite transformé en Acetyl-coenzyme A qui va alimenter le cycle de Krebs et permettre la formation de coenzymes réduits tels que le NADH et le FADH<sub>2</sub> qui sont indispensables au fonctionnement de la chaîne respiratoire, ce qui permet la synthèse d'ATP, c'est la phosphorylation oxydative. La chaîne respiratoire comprend différents transporteurs d'électrons : Le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoreductase, le complexe II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase), le coenzyme Q et le cytochrome c et le complexe V (ATP synthase). Au cours de la phosphorylation oxydative, la translocation à l'extérieur de la membrane interne mitochondriale de protons va être effectuée par les complexes I, II, et III et ce gradient va ensuite être pris en charge par l'ATP synthase qui est une pompe à protons et qui va utiliser l'énergie de ce gradient pour générer l'ATP. Cette sortie de protons est liée à un transfert électronique initié par l'oxydation des coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub>. Le NADH et FADH<sub>2</sub> vont chacun céder 2 électrons qui vont être transportés jusqu'à l'accepteur final, le dioxygène (Gautheron., 1984 ; Kadenbach., 2003) (Fig.21). En conditions anaérobiques, le pyruvate formé va être préférentiellement transformé en lactate qui va sortir de la cellule et venir acidifier le milieu extracellulaire. Dans de nombreux cancers, les cellules voient leur métabolisme énergétique modifié et vont privilégier la voie glycolytique, en présence ou absence d'oxygène, au détriment de la phosphorylation oxydative, c'est l'effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009). Cependant, il est montré que certaines cellules cancéreuses peuvent produire leur ATP par la voie glycolytique (effet Warburg) mais également que d'autres cellules le produisent par la phosphorylation oxydative (Coller., 2014).



**Fig.21** : Les cellules normales vont convertir le glucose en pyruvate dans le cytosol par la glycolyse. Ce pyruvate est ensuite transformé en Acetyl-coenzyme A qui va alimenter le cycle de Krebs et permettre la formation de coenzymes réduits tels que le NADH et le FADH<sub>2</sub> qui vont permettre à la chaîne respiratoire de produire de l'ATP. La chaîne respiratoire comprend différents transporteurs d'électrons : Le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoreductase, le complexe II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase), le coenzyme Q et le cytochrome c et le complexe V (ATP synthase). Un gradient de protons va être généré et permettre de générer l'ATP par l'ATP synthase. En conditions anaérobiques, le pyruvate formé va être préférentiellement transformé en lactate.

#### 3.3.2.4 Implication des PM<sub>2.5</sub> dans le stress oxydatif et la respiration cellulaire

La production d'ERO joue un rôle important dans la mise en place des premiers effets toxiques induits par les PM. En effet, les particules sont capables de réduire l'oxygène et d'induire la formation d'ERO (Baulig et al., 2003 ; Cho et al., 2005 ; Garçon et al., 2006 ; Dergham et al., 2012). Le stress oxydatif induit par les particules peut avoir plusieurs origines. Premièrement, les PM<sub>2.5</sub> principalement, issues de la combustion du bois ou du charbon, contiennent des radicaux libres à leurs surfaces. Ces radicaux libres se forment lorsqu'un précurseur organique s'adsorbe sur un métal oxydé dont le CuO ou le Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ce qui entraîne la réduction de celui-ci par un transfert d'électron. Ces radicaux libres de surface sont une source importante de ERO notamment d'OH qui peuvent être générés par des réactions de Fenton (Gehling et al., 2013, 2014). Deuxièmement, les PM<sub>2.5</sub> contiennent des composés

potentiellement solubles tels que les métaux ou les composés organiques qui vont favoriser le stress oxydatif. Une étude de Li et ses collaborateurs a développé un essai chimique permettant de quantifier la formation d' $O_2^{\cdot-}$  suite à la consommation de dithiothreitol (DTT) induite par les différents composants particuliers (Li et al., 2003). Cette étude et celle de Ntziachristos montrent que l'activité redox des PM est corrélée avec la quantité de carbone organique, de HAP et de certains métaux présents dans les particules (Ntziachristos et al., 2007). Une étude de Künzli et ses collaborateurs a, quant à elle, mesuré la capacité qu'ont les  $PM_{2.5}$  à induire la formation de radicaux hydroxyl ( $OH$ ), de même que leur capacité à dépléter la quantité en antioxydants dont le glutathion ou l'acide ascorbique. Les résultats de cette étude montrent qu'à la fois la formation d' $OH$  et la perte d'antioxydants sont liés à la présence de métaux de transition dont le Fe, Cu, Cr, Ni, V ou encore le Co (Künzli et al., 2006). Troisièmement, les particules vont activer des cellules inflammatoires capables de générer des ERO. Après l'exposition aux PM, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages vont être capables d'induire la production d'une quantité importante d'ERO, la composition chimique, plus particulièrement en métaux et composés organiques des particules, va influencer la production d'ERO par ces mêmes cellules (Becker et al., 1996 ; Knaapen et al., 2004). Quatrièmement, les PM vont altérer les fonctions mitochondriales notamment en interférant la chaîne respiratoire. En effet, les composés organiques particuliers vont entraîner un transport inapproprié des électrons entre les complexes I et III ce qui va favoriser la formation d'anions superoxydes (Xia et al., 2004). Les PM, notamment les particules de diesel, vont également favoriser la dépolarisation de la membrane interne mitochondriale et perturber la synthèse d'ATP (Hiura et al., 2000 ; Upadhyay et al., 2003). Cinquièmement, les  $PM_{2.5}$  vont agir au niveau de facteurs de transcription, dont le *nuclear factor erythroid-2* (NRF2) qui, dans les conditions normales, active une série d'enzymes antioxydantes et detoxifiantes telles que la catalase, la SOD ou la GST afin de contrecarrer la formation de ROS (Kang et al., 2005). De nombreuses études ont montré que NRF2 est activé suite à l'exposition aux PM et participe à la régulation de la production d'ERO (Li et al., 2004 ; Williams et al., 2008 ; Huang et al., 2011). En effet, la surexpression de NRF2 dans des A549 diminue voire supprime la production d'ERO, à l'inverse, une diminution de l'expression de NRF2 entraîne une augmentation de la production d'ERO induite par les  $PM_{2.5}$  (Deng et al., 2013).



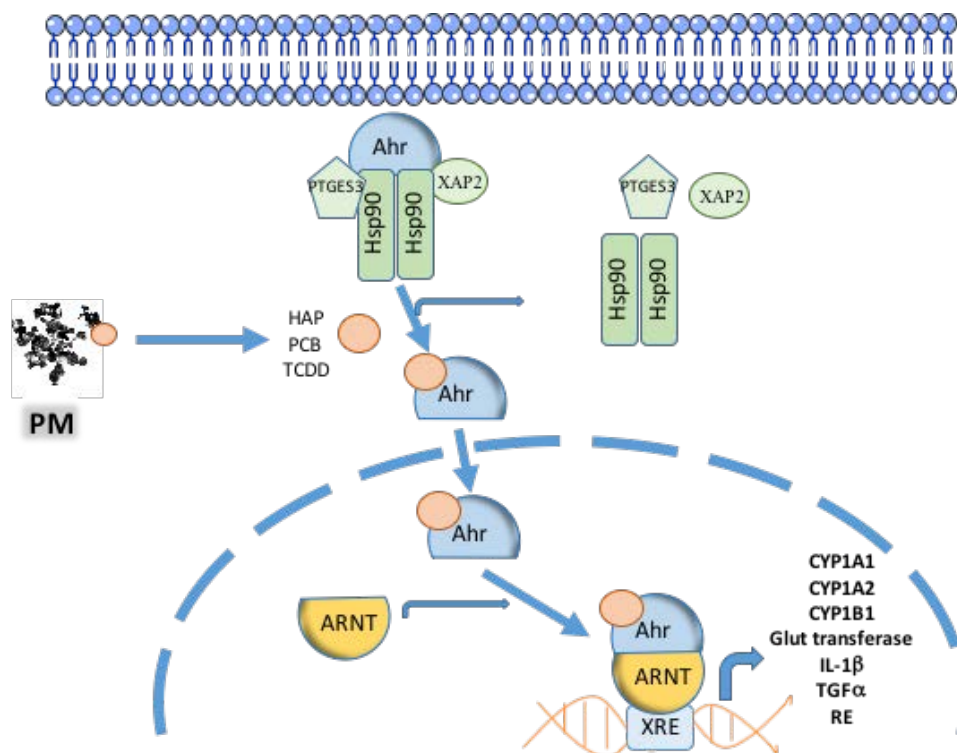
### 3.3.2.5 PM<sub>2.5</sub> et génotoxicité

Différents tests sont utilisés pour évaluer la génotoxicité des PM<sub>2.5</sub>. Le test d'Ames permet d'évaluer le potentiel mutagène d'un composé chimique sur une souche bactérienne, *Salmonella typhimurium*. D'autres tests de mutagenèse sont réalisés sur des cellules eucaryotes telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou des cellules humaines (cellules cancéreuses hépatiques HepG2 ou les cellules cancéreuses colorectales Caco-2). Le test des micronoyaux, réalisé sur cellules de mammifères (Lymphocytes humains ou cellules V79 pulmonaires de hamster chinois), permet de détecter la présence de micronoyaux dans le cytoplasme et donc d'évaluer l'effet clastogène (cassures chromosomiques) et aneugène (anomalie dans le nombre de chromosomes). Le test des comètes est quant à lui utilisé pour détecter les cassures double brin de l'ADN induite par l'exposition de cellules cultivées *in vitro* ou issues d'animaux à un chimique (Claxton and Woodall., 2007 ; de Brito et al., 2013). De nombreuses études ont effectué un extrait organique des particules et ont montré un effet génotoxique de cet extrait. (De Martinis et al., 1999 ; Claxton et al., 2001 ; Zhao et al., 2002 ; de Brito et al., 2013). Les effets génotoxiques des particules sont liés à leur composition chimique, notamment à la présence de composés organiques tels que les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques, qu'ils soient oxygénés, nitrés ou soufrés ou de composés organométalliques (Claxton and Woodall., 2007). Parmi ces composés, les HAP et les HAP nitrés ou nitro-HAP semblent être les plus incriminés (Morales et al., 2006 ; Traversi et al., 2009). Une étude de Andre et ses collaborateurs a montré que des PM<sub>2.5</sub> désorbées thermiquement et qui ne contiennent plus que le « noyau » des particules présentent également un potentiel mutagène qui a été évalué par des tests d'Ames (Andre et al., 2011). Le stress oxydatif est également impliqué dans la formation de dommages à l'ADN et le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) est l'ERO la plus réactive vis à vis de l'ADN. Comme décrit dans le paragraphe 3.3.2.2, la 8OHdG est la lésion oxydative de l'ADN la plus étudiée. En effet, l'inhalation de particules diesel augmente la mutagenèse et la formation de 8OHdG dans les tissus pulmonaires de rats (Sato et al., 2000). Les PM<sub>2.5</sub> sont également impliqués dans l'induction de la 8OHdG, de cassures double brin, dans l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques et de la formation de micronoyaux (Andre et al., 2011 ; Gualtieri et al., 2011 ; Oh et al., 2011 ; De Brito et al., 2013). L' $\cdot\text{OH}$  peut directement induire des cassures double brin de l'ADN lorsque les radicaux sont générés à proximité de l'ADN (Schraufstatter et al., 1988 ; Lloyd et al., 1998). Cependant, les différentes études *in vitro* et *in vivo* qui s'intéressent aux effets des particules sur les dommages à l'ADN utilisent des concentrations

relativement importantes de particules qui ne sont pas pertinentes par rapport aux conditions d'exposition de la population.

### 3.3.2.6 PM<sub>2.5</sub> et métabolisme

Le récepteur AHR est considéré comme étant le récepteur aux contaminants environnementaux mais il s'avère qu'il exerce également un rôle physiologique clé dans l'homéostasie tissulaire. Les principaux ligands environnementaux décrits sont des HAP dont le benzo(a)pyrène (BAP), des polychlorobiphényles (PCB) ou des dioxines telles que la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Sous sa forme inactive, AHR est retenu dans le cytoplasme par un complexe de protéines composé d'un dimère de protéines Hsp90, de la prostaglandin E synthase 3 (PTGES3) et de la X-Associated protéine 2 (XAP2). La liaison du ligand sur son récepteur va induire la translocation nucléaire du récepteur et la désolidarisation du complexe Hsp90/PTGES3/XAP2. Sous sa forme activée, AHR va pouvoir s'hétérodimériser au niveau nucléaire avec la protéine ARNT, se fixer sur l'ADN sur des éléments de réponse *Xenobiotique Response Element* (XRE) et induire la transcription de gènes cibles. Parmi les gènes cibles sont retrouvés des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques tels que *CYP1A1*, *1A2*, *1B1*, ou encore des *gluthation transférases*, des gènes codants pour l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), le TGF $\alpha$  ou le récepteur aux estrogènes (RE), etc...(Pour revues : Beischlag et al., 2008 ; Kung et al., 2009). Les composés organiques des PM<sub>2.5</sub> et leur solubilisation entraînent l'activation de AHR et donc induisent la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques précédemment décrits (Gualtieri et al., 2011) (Fig.22).



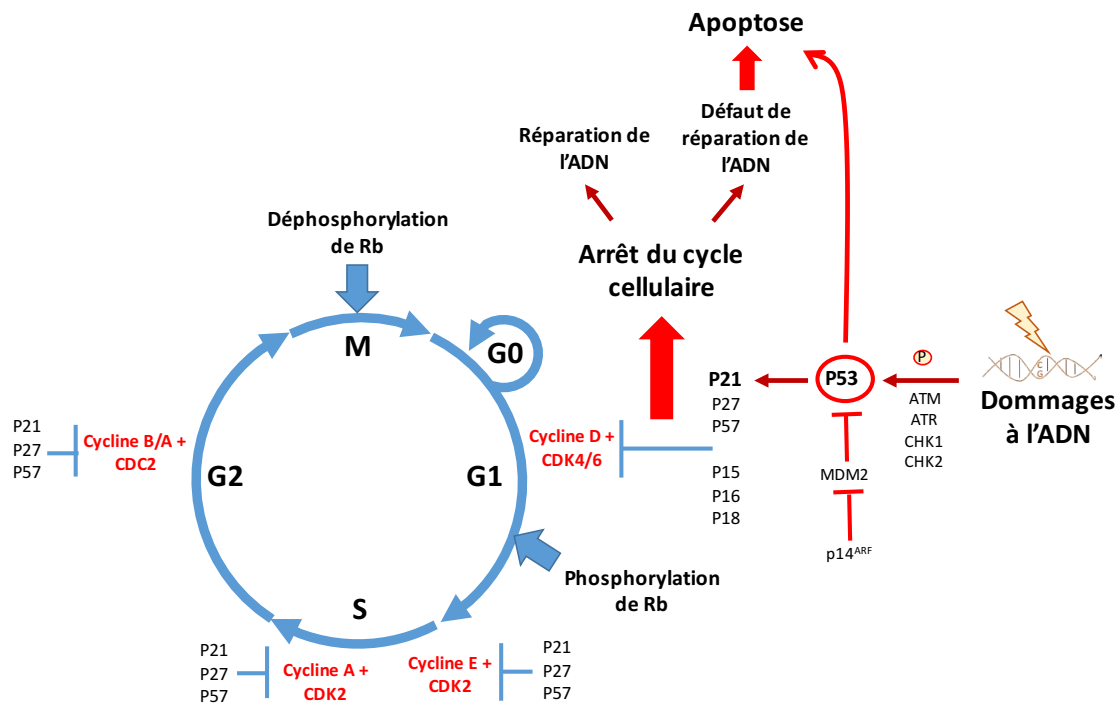
**Fig.22** : Voie d'activation de l'AHR. Lorsque le ligand (HAP, PCB ou TCDD) va se lier au récepteur AHR, il va être transloqué au noyau et venir se lier à l'ARNT. Ce complexe va pouvoir se fixer sur le XRE et transcrire les gènes cibles dont CYP1A1, 1A2, 1B1, Glutathion transférase, IL-1 $\beta$ , TGF $\alpha$  ou récepteur aux estrogènes (RE).

### 3.3.2.7 PM<sub>2.5</sub>, cycle cellulaire, dommages à l'ADN et apoptose

#### 3.3.2.7.1 Cycle cellulaire et dommages à l'ADN

Le cycle cellulaire est un processus fondamental qui permet à partir d'une cellule mère de donner deux cellules filles identiques. Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases : G1 (Gap 1), S (Synthèse ou Réplication), G2 (Gap 2), M (Mitose) et lorsque les cellules ne sont pas en division elles entrent en phase de quiescence ou phase G0. Les phases G1 et G2 sont des phases de croissance et de préparation pour les phases S et M, respectivement. La phase S permet de répliquer l'ADN et la phase M permet de former deux cellules filles identiques à partir d'une cellule mère (Pines and Rider., 2001). Chaque étape du cycle est finement régulée par différents points de contrôle qui sont constitués d'un complexe de protéines formé de Cyclines et de CDKs qui permettent la progression dans le cycle cellulaire (Malumbres and Barbacid., 2009). Par exemple, la protéine Rb est associée au facteur de transcription E2F, une fois phosphorylée par les Cyclines/CDKs, la protéine Rb va libérer la protéine E2F qui va à son tour induire la transcription de gènes essentiels à la progression du cycle en phase S (Suryadinata et al., 2010). L'activité des complexes Cyclines/CDKs est quant à elle contrôlée par différents mécanismes

dont l'action des inhibiteurs de CDK. Deux familles sont impliquées dans l'inhibition des CDKs : la famille INK4 qui comprend les protéines p15, P16, p18 et la famille CIP/KIP qui comprend les protéines P21, P27 et P57 (Sherr and Roberts., 1999 ; Vidal and Koff., 2000). Suite à un stress oxydatif ou à des dommages à l'ADN, la protéine P53 est activée, elle aura pour rôle d'arrêter le cycle cellulaire, de favoriser la réparation de l'ADN et d'induire l'apoptose. P53 est régulée par la protéine MDM2 qui va empêcher son activité et conduire à sa dégradation. Cependant, suite à des dommages à l'ADN, P53 va être phosphorylée par des protéines telles que ATM, ATR, CHK1 et CHK2, cette phosphorylation va empêcher la liaison de la protéine MDM2 qui ne pourra plus exercer son effet inhibiteur sur P53 (Cheng et al., 2009). De plus, l'activation de P53 va également être stimulée par la protéine p14<sup>ARF</sup> en séquestrant MDM2 et en l'empêchant d'exercer son rôle répressif sur P53 (Llanos et al., 2001). Les inhibiteurs de cyclines/CDKs peuvent également être régulés par d'autres protéines dont P53 qui va activer la protéine P21 et donc induire l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, elle peut également induire l'arrêt en phase G2 par des mécanismes qui ne seront pas décrits dans ce manuscrit (Shaw et al., 1996) (Fig.23).

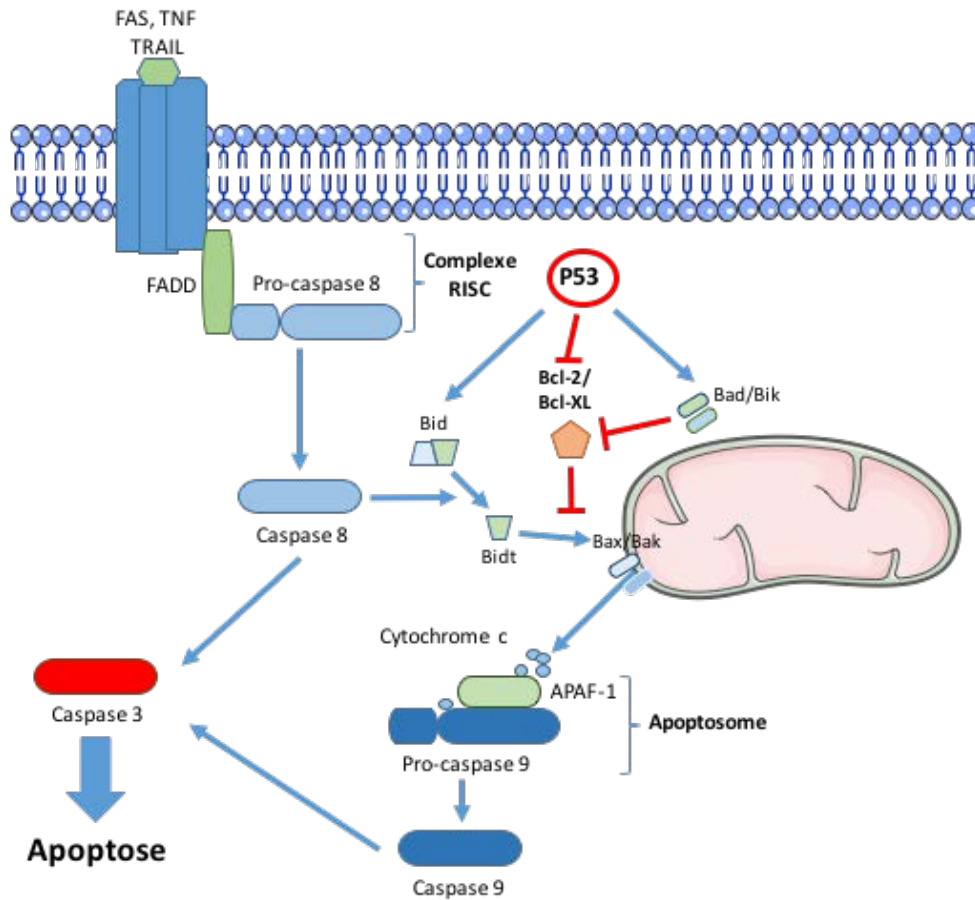


**Fig.23** : Cycle cellulaire et dommages à l'ADN : rôle de la protéine P53. Le cycle cellulaire est régulé par des complexes protéiques nommés cycline/CDK, ces complexes sont à leur tour régulés par des inhibiteurs du cycle cellulaire dont P21 ou P16. La progression des cellules en phase G1/S et G2/M est au statut de phosphorylation de la protéine Rb. Suite à des dommages à l'ADN, les protéines ATM, ATR, CHK1/2 vont entraîner la phosphorylation de P53 qui va à son tour activer la protéine P21 et induire l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Cet arrêt du cycle permet aux cellules de réparer l'ADN ou à défaut d'induire l'apoptose. P53 peut également directement favoriser l'apoptose.

### 3.3.2.7.2 Mort cellulaire

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme impliqué dans le développement, dans l'immunité et est indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules qui pourraient nuire à l'organisme. La dérégulation de L'apoptose conduit à un état pathologique dont la tumorigenèse où l'apoptose est inhibée (Spurgers et al., 2006). L'apoptose fait intervenir une famille de protéases, les caspases ou *cysteiny aspartate-specific proteinases*. Ces enzymes sont capables de cliver d'autres protéines du côté C-terminal d'un acide aspartique. Deux groupes de caspases sont majoritairement impliqués dans l'apoptose : les caspases dites initiatrices (Casp 8, 9 et 10) qui vont activer la cascade protéolytique et les caspases effectrices (Casp 3, 6 et 7) qui vont cliver les protéines ciblées. De manière simplifiée, deux voies permettent de conduire à l'apoptose, la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort ou la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. Dans la voie mitochondriale, des signaux de mort tels que des dommages à l'ADN, une anomalie du cycle cellulaire ou une privation en facteur de croissance vont conduire à la perméabilisation des membranes mitochondriales qui conduira au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c relargué va recruter la protéine *Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) ainsi que la caspase 9 sous sa forme non active (Pro-caspase 9) afin de former un complexe nommé apoptosome. La formation de l'apoptosome favorise l'activation de la caspase 9 qui à son tour active la caspase 3 effectrice et initie l'apoptose. La voie des récepteurs de mort comprend des récepteurs membranaires dont les récepteurs aux ligands FAS, TNF ou TRAIL. La fixation de ces différents ligands à leurs récepteurs va induire la formation d'un complexe nommé RISC qui permet le recrutement de la protéine FADD et de la caspase 8 inactive (Pro-caspase 8) et permet de l'activer. La caspase 8 activée peut à son tour aller activer la caspase 3 et permettre l'initiation de l'apoptose. Les caspases sont à leur tour régulées par d'autres protéines dont les protéines de la famille BCL-2. Parmi ces protéines certaines sont dites anti-apoptotiques dont les protéines BCL-2, BCL-XL ou Mcl-1 et d'autres pro-apoptotiques, il s'agit des protéines Bax, Bak, Bik, Bid ou Bad. La protéine Bid est clivée par la Caspase 8 pour générer une protéine Bid tronquée qui favorise le relargage du cytochrome c avec l'aide des protéines Bax et Bak. Au contraire, les protéines BCL-2 et BCL-XL veillent à l'intégrité de la membrane mitochondriale en empêchant le relargage du cytochrome c et ce en bloquant les protéines Bax, Bak et Bid et les protéines Bad et Bik vont à leur tour inhiber les protéines BCL-2 et BCL-XL. La protéine P53 joue un rôle important dans l'apoptose puisqu'elle stimule la production de

molécules pro-apoptotiques dont Bid, Bax, Bak ou Apaf-1 et inhibe l'action des protéines anti-apoptotiques (Pour revues : Hougardy et al., 2005 ; Wagner., 2005 ; Cotter., 2009) (Fig.24).



**Fig.24** : Mécanismes conduisant à l'apoptose. L'apoptose est composée de deux voies majeures : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort ou la voie intrinsèque ou voie mitochondriale. Dans la voie mitochondriale, le cytochrome c relargué va former un complexe avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase 9 nommés apoptosome. La formation de l'apoptosome favorise l'activation de la caspase 9 qui a son tour active la caspase 3 effectrice et initie l'apoptose. La voie des récepteurs de mort comprend des récepteurs membranaires dont les récepteurs aux ligands FAS, TNF ou TRAIL. La fixation de ces différents ligands à leurs récepteurs va induire la formation d'un complexe nommé RISC qui permet le recrutement de la protéine FADD et de la pro-caspase 8 et permet de l'activer. La caspase 8 activée peut à son tour aller activer la caspase 3 et permettre l'initiation de l'apoptose. La protéine Bid est clivée par la Caspase 8 pour générer une protéine Bid tronquée qui favorise le relargage du cytochrome c via les protéines Bax et Bak. Au contraire, les protéines BCL-2 et BCL-XL veillent à l'intégrité de la membrane mitochondriale en empêchant le relargage du cytochrome c et ce en bloquant les protéines Bax, Bak et Bid et les protéines Bad et Bik vont à leur tour inhiber les protéines BCL-2 et BCL-XL. La protéine P53 joue un rôle important dans l'apoptose puisqu'elle stimule la production de molécules pro-apoptotiques dont Bid, Bax, Bak ou Apaf-1 et inhibe l'action des protéines anti-apoptotiques

### 3.3.2.7.3 Effets des PM<sub>2.5</sub> sur le cycle cellulaire et la mort cellulaire

Les effets des particules sur le cycle cellulaire restent peu étayés et assez controversés ceci étant lié aux particules utilisées, à la dose, aux temps d'incubation et aux différentes lignées utilisées (Jalava et al., 2007 ; Longhin et al., 2013). Il est montré que les particules peuvent induire un arrêt dans le cycle cellulaire en mitose et que cet arrêt est corrélé avec une quantité importante de HAP (Gualtieri et al., 2010 ; Longhin et al., 2013). Les arrêts mitotiques observés suite à l'exposition aux PM sont également associés à la présence d'agents, dont l'Arsenic et le Chrome, qui vont perturber le fuseau mitotique et donc les microtubules qui le composent (Seoane et al., 2001 ; Rossman et al., 2003). Des expériences de cytométrie en flux ont montré une augmentation du nombre de cellules en G2/M et une augmentation des cellules en sub-G1 ce qui correspond à une augmentation de cellules en apoptose (Gualtieri et al., 2010). Une étude de Longhin et ses collaborateurs montre qu'une dose relativement faible de PM<sub>2.5</sub> induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et augmente la multinucléation et la formation de micronoyaux (Longhin et al., 2013). Les particules induisent une inhibition de l'activité cycline/CDK et une activation de l'inhibiteur de cycline/CDK, P21 ce qui favorise l'arrêt des cellules A549 en G1 (Zhang et al., 2007). De plus, une étude utilisant des particules diesel sur des macrophages a montré une diminution de l'expression de MDM2 qui ne peut donc plus jouer son rôle d'inhibiteur de P53 (Yun et al., 2009). Au contraire, d'autres études montrent que les PM<sub>2.5</sub> favorisent la prolifération cellulaire de fibroblastes humains (Timblin et al., 2002 ; Deng et al., 2007). D'autres études montrent une induction à la fois de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire suggérant la présence de différentes populations au sein des cellules traitées par les PM<sub>2.5</sub>. Dans ces études, une augmentation de P53 et de sa phosphorylation ont été mesurées de même qu'une augmentation de P21 favorisant donc l'arrêt dans le cycle cellulaire. A l'inverse, une augmentation de Rb et de sa forme phosphorylée a été mesurée ce qui peut favoriser la progression des cellules dans le cycle en phase S (Abbas et al., 2010 ; Abbas et al., 2016).

Comme décrit dans le paragraphe 3.3.2.5, les particules fines induisent des dommages à l'ADN dans différentes lignées cellulaires ceci étant principalement lié aux HAP et métaux présents dans les particules (Binkova et al., 2003 ; Karlsson et al., 2004 ; Meng et al., 2007). Cette notion est renforcée par la mesure d'une faible augmentation d'ATM ou CHK2 et de P53 observée suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> qui va induire un arrêt des cellules dans le cycle cellulaire. Les HAP peuvent induire la formation de métabolites qui se lient de manière covalente à l'ADN (Billet et al., 2008). De plus, ces composés vont favoriser la formation

d'ERO qui comme décrit au paragraphe 3.3.2.2, peuvent induire la formation de dommages à l'ADN dont la 8OHdG.

De même que pour le cycle cellulaire, les mécanismes par lesquels les PM<sub>2.5</sub> vont influencer l'apoptose sont peu documentés et se contredisent. Les PM<sub>2.5</sub> peuvent par un stress oxydatif important et des dommages à l'ADN tels que des cassures chromosomiques induire l'apoptose dans des cellules 16-HBE et ce de par un mécanisme faisant intervenir P53 (Zhou et al., 2014). La composition des particules peut avoir une influence importante sur l'apoptose. En effet, les HAP peuvent induire l'apoptose en favorisant la voie mitochondriale et l'intervention de P53 (Franco et al., 2009). Les métaux jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose par la génération d'ERO, une surexpression de P53 et des caspases et une diminution de l'expression de la protéine BCL-2 (Pulido et al., 2003). A l'inverse une étude de Feracatu et ses collaborateurs montre un effet anti-apoptotique des PM<sub>2.5</sub> utilisées à faible dose (10µg/cm<sup>2</sup>). Selon les auteurs, l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et la désorption des HAP entraîne l'activation du récepteur AHR et cette activation favoriserait l'effet anti-apoptotique des particules en régulant les gènes impliqués dans la voie mitochondriale de l'apoptose (Feracatu et al., 2010). En effet, AHR peut, en plus de son activité détoxifiante, jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose en favorisant l'expression des protéines BCL-2, BCL-XL ou Mcl-1 et en inhibant l'expression de Apaf-1 ou Bak. (Marlowe et al., 2008 ; Cheng et al., 2003)

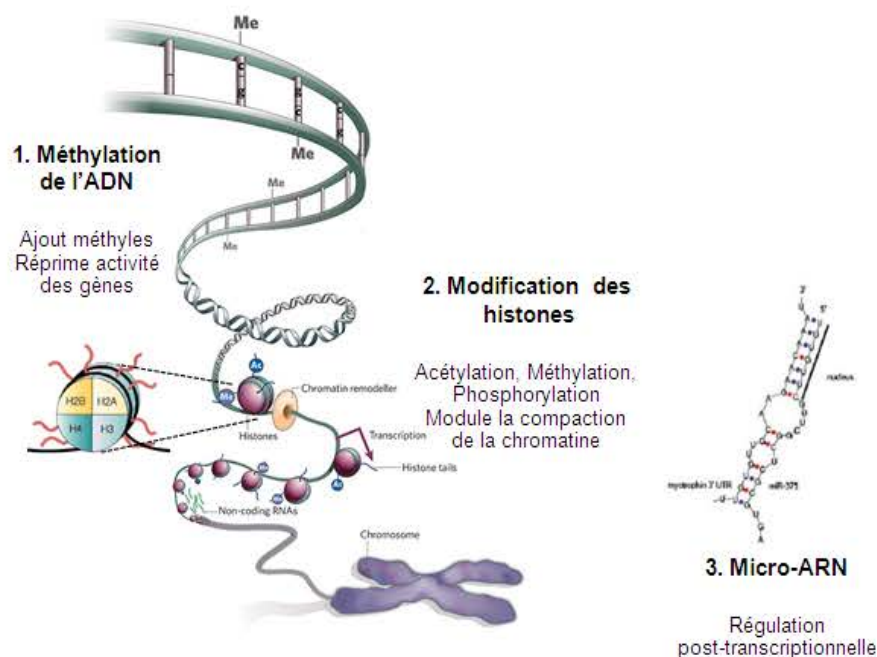
### 3.3.2.8 PM<sub>2.5</sub> et épigénétique

#### 3.3.2.8.1 Généralités sur les mécanismes épigénétiques.

Les modifications épigénétiques sont définies comme les changements qui n'influent pas la séquence codante du génome mais peuvent affecter l'expression des gènes. A l'image du génome, l'épigénome peut être transmis à la descendance et son maintien est indispensable au développement normal et au fonctionnement tissulaire. Les marqueurs épigénétiques sont indispensables à l'identité des différents types cellulaires de même que dans la reprogrammation cellulaire notamment des cellules souches (Hochedlinger et al., 2015). De plus, l'épigénome peut, à l'instar du génome, varier en fonction de l'âge ou de l'environnement. La dérégulation de l'épigénome est impliquée dans la pathogenèse, telle que la cancérogenèse ou l'apparition de maladies génétiques héréditaires (Jones et al., 2002 ; Qui., 2006 ; Allis and Jenuwein., 2016).



Il existe trois mécanismes épigénétiques majeurs parmi lesquels deux influent sur la structure de la chromatine en modifiant ses différents composants ; la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Qui., 2006). En effet, la chromatine est une macromolécule qui comprend l'ADN et les protéines histones, indispensables à la structure du génome. L'unité fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome, il comprend 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones comprenant deux histones de chaque H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H3 et H4 (Strahl et al., 2000). La chromatine est divisée en deux régions, l'hétérochromatine qui est ultra-condensée et qui contient essentiellement des gènes dits inactifs et l'euchromatine qui contient la majeure partie des gènes actifs. Le troisième mécanisme épigénétique est associé à la présence d'ARN non codants dont les micro-ARN permettant une régulation post-transcriptionnelle (Qui., 2006) (Fig.25). Les modifications épigénétiques inhérentes à l'exposition aux PM sont peu documentées et les mécanismes exacts restent encore mal compris.

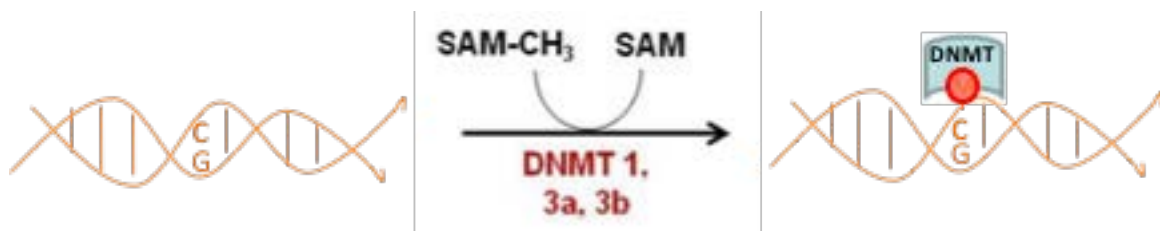


**Fig.25** : Illustration des trois modifications épigénétiques les plus importantes. 1. Méthylation de l'ADN, 2. Modification des histones et 3. Micro-ARN. D'après Qui., 2006.

### 3.3.2.8.2 Mécanismes impliqués dans la méthylation de l'ADN et sa régulation.

Une des modifications épigénétiques les plus étudiées est la méthylation de l'ADN puisqu'elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que le développement

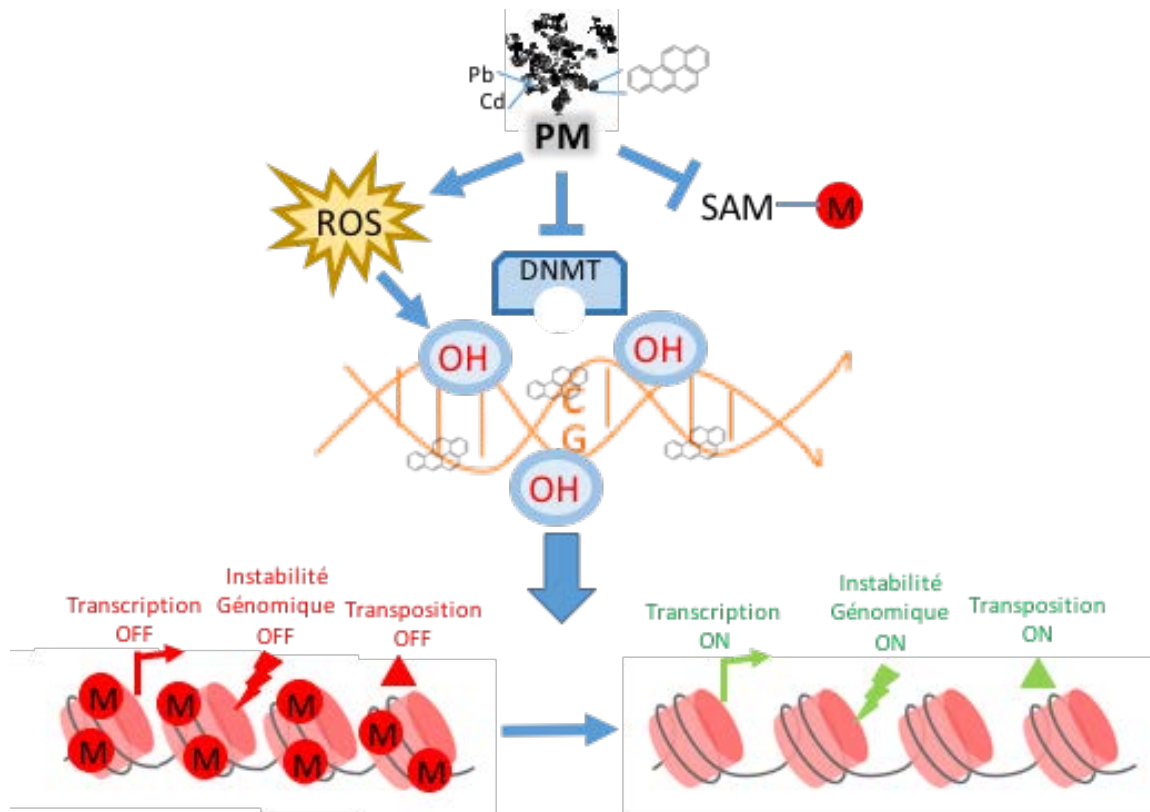
embryonnaire, l’empreinte génomique ou encore la stabilité des chromosomes. De plus, la méthylation aberrante de l’ADN conduit à la pathogénèse où l’implication dans le cancer est la plus décrite (Jones et al., 2002). Chez les mammifères, l’addition d’un groupement méthyle s’effectue sur les groupements cytosines et fait intervenir une grande famille de protéines ; les méthyltransférases de l’ADN ou *DNA Methyltransferase* (DNMTs), on retrouve DNMT1, -3a et -3b parmi les plus importantes, ces DNMT induisent la méthylation et le maintien des méthyles sur l’ADN (Robertson et al., 2000) (Fig.26). Environ 55% du génome comprend des éléments de répétition, dont environ 500.000 éléments *Long Interspersed Nucleotide Elements* (LINE-1) et 1.4 million de répétitions Alu, qui sont des retro-transposons repartis dans le génome, ces séquences répétées sont fortement méthylées (Yang et al., 2004). La déméthylation des éléments LINE-1 et Alu augmente leur activité de retro-transposition ce qui augmente l’instabilité génomique par insertions ou recombinaisons homologues et contribue à la dérégulation de la transcription (Han et al., 2004). En parallèle, d’autres séquences constituées de la répétition d’un dinucléotide CpG, nommées îlots CpG, sont principalement retrouvées au niveau des régions promotrices ou des premiers exons des gènes (Robertson et al., 2000). De manière générale, l’hyperméthylation de ces îlots est associée à la diminution voire répression d’un gène. En effet, au cours de la cancérogenèse, l’hyperméthylation de certains promoteurs est associée à la diminution de l’expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Robertson et al., 2000). De récentes études ont établi une relation entre la méthylation de l’ADN et l’exposition aux polluants atmosphériques, notamment aux PM (Baccarelli et al., 2009).



**Fig.26** : Méthylation de l’ADN. Chez les mammifères, l’addition d’un groupement méthyle s’effectue sur les groupements cytosines en C5 et fait intervenir une grande famille de protéines ; les méthyltransférases de l’ADN ou *DNA Methyltransferase* (DNMTs), on retrouve DNMT1, -3a et -3b parmi les plus importantes, ces DNMT induisent la méthylation et le maintien des méthyles sur l’ADN. Ces méthyltransférases ont besoin de donneurs de méthyles, les *S-Adenosyl Methionine* (SAM) pour méthyler l’ADN.

### 3.3.2.8.3 Méthylation de l'ADN et effets des PM.

Les composants chimiques particuliers peuvent influencer de manière directe ou indirecte le profil de méthylation de l'ADN (Baccarelli et al., 2009). L'exposition à forte dose de PM est associée à une hypométhylation du génome, liée à la diminution de l'expression de DNMT1 ce qui va donc favoriser l'activation de certains gènes. En particulier, la diminution de la méthylation des éléments LINE-1 est observée suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> conduisant à l'instabilité génomique par augmentation de l'activité de rétrotransposition (Baccarelli et al., 2009). De plus, les PM entraînent une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui augmente la formation d'adduits à l'ADN (Baccarelli et al., 2009). Ces adduits vont donc perturber la liaison des méthyltransferases à l'ADN et favoriser le maintien de l'hypométhylation de l'ADN notamment au niveau des îlots CpG (Baccarelli et al., 2009). Les PM vont également de manière directe et via les ERO inhiber l'activité des SAM (S-Adenosyl Methyltransferase) qui sont des donneurs de méthyles indispensables pour l'activité des DNMTs, cette action entraîne une forte diminution de la méthylation globale du génome. De nombreuses études ont établi une association entre la méthylation de l'ADN et l'exposition aux métaux environnementaux qui sont retrouvés présents dans les particules. Les métaux exercent une influence indirecte sur le profil de méthylation de l'ADN en stimulant la génération d'ERO qui crée des dommages oxydants à l'ADN et perturbent la liaison des méthyltransferases à l'ADN. Ils possèdent également des effets directs et modulent l'expression des DNMTs. En effet, le cadmium inhibe l'activité DNMTs en s'y liant ce qui empêche son interaction avec l'ADN et conduit à une hypométhylation globale de l'ADN (Filipic et al., 2012). Le plomb est associé à la diminution de la méthylation des éléments LINE-1 qui favorise l'instabilité génétique (Wright et al., 2010). Les HAP sont un groupe de produits chimiques organiques, le plus souvent associés aux PM et issus de la combustion incomplète de certains matériaux. L'exposition aux HAP est associée à une hypométhylation globale de l'ADN, alors que d'autres études montrent une hyperméthylation sur les sites CpG. Les mécanismes conduisant à l'hypométhylation ne sont pas encore bien compris, cependant, les HAP induisent la production d'ERO entraînant une diminution de la méthylation de l'ADN. Les métabolites des HAP sont également capables de former des adduits à l'ADN, ce qui perturbe la liaison des DNMTs empêchant le greffage de résidus méthyles sur l'ADN. De plus, il semblerait que les HAP aient une action inhibitrice sur les SAM entraînant une forte diminution de la méthylation globale du génome (Baccarelli et al., 2009) (Fig.27).

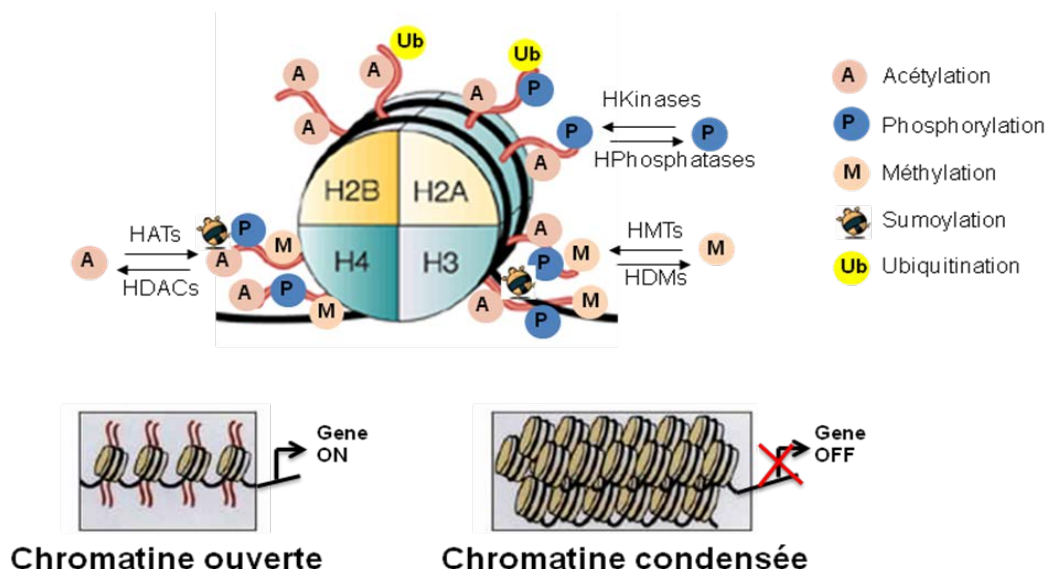


**Fig.27** : L'exposition aux PM induit des modifications de méthylation de l'ADN. Les PM induisent une inhibition des méthyltransférases de l'ADN (DNMT), une hyperoxydation de l'ADN et la formation d'adduits des métabolites des HAP à l'ADN empêchant, tous deux, la fixation des DNMT et perturbe l'activité des *S-Adenosyl Methionine* (SAM). Toutes ces modifications ont pour conséquence d'induire une hypométhylation ou parfois hyperméthylation sur les îlots CpG de l'ADN favorisant ou défavorisant la transcription de certains gènes, elles favorisent l'instabilité génomique ou encore la transposition de portion d'ADN.

#### 3.3.2.8.4 Mécanismes impliqués dans la modification des histones.

Chez les eucaryotes, l'ADN est empaqueté dans les nucléosomes qui sont constitués d'un octamère d'histones comprenant quatre dimères d'histones H2A, H2B, H3 et H4 (Hartzog et al., 1997). Les histones sont elles-mêmes soumises à des modifications telles que la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation au niveau de la queue C-terminale qui constitue une surface d'exposition importante pour les interactions avec d'autres protéines (Hartzog et al., 1997). Parmi ces modifications, l'acétylation des histones est la plus étudiée, elle fait intervenir deux enzymes importantes : les histones acétyltransférases (HATs) et les histones desacétylases (HDACs). L'acétylation s'effectue sur des résidus lysine de la queue C-terminale de l'histone et est fondamentale pour la régulation de la transcription. Généralement, l'hyperacétylation est présente dans les régions transcriptionnelles actives, à l'inverse, l'hypoacétylation est retrouvée dans les régions non transcrites à la fois dans l'hétérochromatine

que dans l'euchromatine (Egger et al., 2004). La méthylation des histones se fait principalement sur des résidus lysine et également arginine et est un marqueur à la fois d'activation et d'inactivation de régions chromatinienne. Par exemple, la méthylation de l'histone H3 est retrouvée dans les promoteurs des gènes actifs (Egger et al., 2004). La méthylation de la Lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4) est fortement associée à l'activation de la transcription alors que la méthylation sur la lysine 27 (H3K27) est associée à la répression de l'expression de gènes (Yang et l., 2011). La phosphorylation des histones est plus compliquée à interpréter car les effets seront différents selon les résidus phosphorylés et il existe des effets combinatoires que cela soit avec d'autres résidus phosphorylés ou avec des résidus acétylés ou méthylés (Loury et al., 2003) (Fig.28). Les modifications des histones sont impliquées dans le développement mais également dans la pathogenèse, notamment la cancérogenèse (Chervona et al., 2012). Plus récemment, des études ont mis en évidence le rôle important des modifications des histones dans la toxicité induite par des polluants atmosphériques. Cependant très peu de résultats sont disponibles, notamment pour les HAP alors que les effets des métaux sur ces modifications sont beaucoup plus documentés.



**Fig.28** : Nucléosome et modifications des histones. Parmi ces modifications sont retrouvées, l'acétylation des histones qui fait intervenir deux enzymes, les histones acetyltransferase (HATs) et les histones desacetylase (HDACs). L'acétylation s'effectue sur des résidus lysine de la queue C-terminale de l'histone. La méthylation des histones se fait principalement sur des résidus lysine et également arginine. La phosphorylation des histones est effectuée sur des résidus sérine. On retrouve également d'autres modifications telles que la sumoylation ou ubiquitination. Ces modifications vont conduire à des modifications structurelles de la chromatine et conduire à la décondensation ou condensation de la chromatine. La chromatine sous sa forme ouverte va permettre la transcription des gènes et sous la forme condensée va favoriser la répression génique

#### 3.3.2.8.5 Modifications des histones et polluants atmosphériques.

L'exposition aux PM, notamment aux PM<sub>10</sub>, induit un accroissement de l'activité HAT de même qu'un accroissement global de l'acétylation des histones H4 ce qui entraîne l'augmentation de l'expression de certains gènes, notamment impliqués dans les processus inflammatoires tels que l'IL-8 (Ji et al., 2012). Une étude de 2015 montre une augmentation de l'acétylation de l'histone H3K27, notamment sur des gènes spécifiquement impliqués dans la coagulation sanguine, l'activation des plaquettes et l'homéostasie tissulaire (Liu et al., 2015). Cependant, l'implication exacte des PM dans les modifications des histones est mal comprise probablement dûe à la complexité de leur composition. Concernant, les effets des métaux, le nickel entraîne une réduction de l'acétylation des histones, notamment de l'histone H4 et une augmentation de la déméthylation des histones H3 sur la lysine 9, participant à l'inactivation de certains gènes, notamment des gènes suppresseurs de tumeur (Martinez-Zamudio et al., 2011). Les ions nickel sont associés à une augmentation de la méthylation conduisant, dans ce cas, à l'extinction de l'expression de gènes dont le gène *spry2* qui est un régulateur négatif des Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) dont l'implication dans la survie, la prolifération ou la migration cellulaire n'est plus à démontrer (Martinez-Zamudio et al., 2011). Une exposition courte à l'arsenic montre une augmentation de l'acétylation des histones H4 et une exposition chronique entraîne l'accroissement de la méthylation des histones H3, participant tous deux à une rapide activation des gènes cibles tels que des oncogènes tels que *c-jun/c-fos* qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire (Martinez-Zamudio et al., 2011). L'exposition au chrome semble être liée à l'augmentation de la diméthylation de H3K9 et de la triméthylation de H3K4 (Zhou et al., 2009). Il est montré que l'hyperacétylation des histones H3 et H4 est retrouvée dans les cellules suite à un traitement au Benzo(a)pyrène (B(a)P). Il semblerait que cet effet soit lié à l'activation des cytochromes p450 1a1 (CYP1A1) via le récepteur AHR. En effet, l'expression du *CYP1A1* est induite suite à l'exposition aux HAP et va permettre de les métaboliser, notamment le B(a)P. L'induction du CYP1A1 par les HAP entraîne donc l'hyperacétylation des histones H3 et H4, la méthylation des histones H3 et la phosphorylation des histones H3, favorisant la transcription de certains gènes cibles (Schnekenburger et al., 2007) (Fig.29).

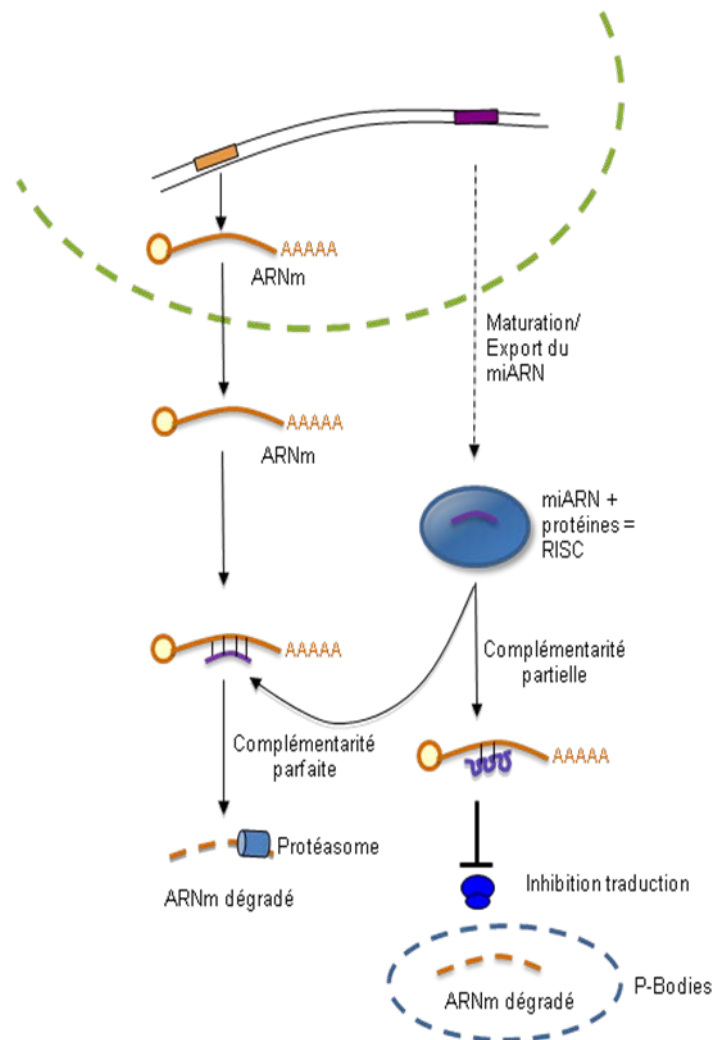
Exposition	Effets sur les histones	Mécanismes	Gènes impliqués
<b>PM</b>	Accroissement de l'activité HAT → accroissement global de l'acétylation des H4 Accroissement de H3K27		 Chromatine ouverte Inflammation (IL-8) et cancer Coagulation, homéostasie tissulaire
<b>Nickel</b>	Réduction acétylation des H4 Augmentation de la Déméthylation des H3		 Chromatine condensée Gènes supp de tumeur (Spry2) → Régulation négative des RTK
<b>Arsenic</b>	Exposition courte: Augmentation de l'acétylation des H4 Exposition longue: Augmentation de la méthylation des H3		 Chromatine ouverte Favorise la transcription de c-jun/c-fos → Favorise la prolifération cellulaire
<b>HAPs</b>	Hyperacétylation des H3 et H4 Méthylation et Phosphorylation des H3		 Chromatine ouverte Cancer?

**Fig.29** : Tableau récapitulatif qui reprend les effets des PM, des métaux et HAP sur les modifications des histones avec des exemples de gènes cibles. RTK: Récepteur Tyrosine Kinase, HAT: Histone AcetylTransferases.

### 3.3.2.8.6 Implication des micro-ARN dans la régulation post-transcriptionnelle.

Les micro-ARNs (miRNAs) sont une classe de petits ARN non-codants d'une longueur d'environ 22 nucléotides. Ils régulent de façon négative l'expression de gènes cibles en se liant sur la région 3' non traduite (3'UTR) des ARN messagers (ARNm) (Hou et al., 2011). Les miRNAs sont impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que le développement, la prolifération cellulaire et également l'immunité et l'inflammation. En parallèle, des études ont révélé l'implication de la dérégulation ou de la modification de l'abondance de certains miRNAs dans la pathogenèse, tels que le cancer, les maladies neurodégénératives ou les maladies cardiaques (Hou et al., 2011). Une fois mature, le miRNAs est intégré au complexe ribonucléique RISC (RNA Induced Silencing Complex). La séquence de chaque miRNAs peut être parfaitement ou partiellement complémentaire de celles de plusieurs ARNm. Lorsque la séquence du miRNAs est parfaitement complémentaire, sa dégradation est assurée par clivage par le complexe RISC. Dans le cas d'une séquence partiellement complémentaire, la traduction de l'ARNm va être bloquée puis l'ARNm va être dégradé dans des granules nommées PBodies (*Processing Bodies*) qui sont des complexes

protéiques qui séquestrent les ARNm et assurent leur dégradation progressive (Ameres et al., 2007) (Fig.30). De récentes études ont permis de mettre en évidence que l'exposition aux toxiques environnementaux est capable d'induire des changements d'expression des miRNAs.



**Fig.30** : Synthèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible. Une fois mature, le miRNAs est intégré au complexe ribonucléique RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Lorsque la séquence du miRNAs est parfaitement complémentaire, sa dégradation est assurée par clivage par le complexe RISC suivie de la dégradation du miARN par le protéasome. Dans le cas d'une séquence partiellement complémentaire, la traduction de l'ARNm va être bloquée puis il va être désadénylé et l'ARNm va être dégradé dans des granules nommées PBodies (*Processing Bodies*).



### 3.3.2.8.7 miARNs et effets des PM.

Peu de données sont disponibles concernant l'impact de la pollution atmosphérique sur l'expression des microARN. L'utilisation de puces à micro-ARNs a permis de montrer des modifications importantes de l'expression des miARNs dans les cellules épithéliales bronchiques traitées par des particules de diesel. Parmi les 313 miARNs analysés, 130 étaient retrouvés surexprimés et 67 sous-exprimés suite à l'exposition aux PM (Jardim et al., 2009). 12 miRNAs ont été retrouvés modulés d'un facteur supérieur à 4 et parmi les cibles de ces miRNAs sont retrouvés des gènes impliqués dans l'inflammation et la tumorigenèse. De plus, une étude réalisée à Milan sur les travailleurs d'une aciérie montre que l'exposition à des PM enrichies en métaux induit un changement rapide de l'expression de deux miARNs impliqués dans l'inflammation et impliqués dans la cancérogenèse : le miR-21 et miR-222. Une étude de Rodosthenous et ses collaborateurs a évalué l'effet des PM<sub>2.5</sub> sur l'expression de miRNAs et ont recherché l'éventuelle présence de 800 miRNAs dans le sérum de 22 patients âgés. Parmi les miRNAs analysés, 16 ont été identifiés dont miR-126-3p et miR-146a-5p, et sont notamment impliqués dans la régulation de gènes impliqués dans les pathologies cardiaques dont l'athérosclérose (Rodosthenous et al., 2016). Une autre étude menée par Liu et ses collaborateurs a identifié des miRNAs qui sont exprimés de manière aberrante dans des cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées exposées aux PM<sub>2.5</sub>. La surexpression des gènes SLC30A1, SERPINB2 et AKR1C1 est liée à la sous expression des miR-182 et miR-185 dans les cellules exposées aux PM<sub>2.5</sub>, ce qui est également retrouvé dans les tumeurs pulmonaires humaines (Liu et al., 2015). Concernant le cadmium, l'augmentation de l'expression des miARN-146a dans les leucocytes est fortement associée à l'inhalation de particules enrichies en cadmium, ce qui participe à l'inflammation (Hou et al., 2011). L'exposition des cellules bronchiques humaines au B(a)P induit des modifications d'expression des microARNs. Le miARN-494 est retrouvé surexprimé dans les cellules bronchiques humaines et est impliqué dans la survie cellulaire (Duan et al., 2010) (Fig.31).

Exposition	miRNA ciblés	Cibles
<b>PM</b>	Augmentation de l'expression des <b>miR-21</b> et <b>miR-222</b> dans la circulation sanguine Augmentation des <b>miR-126-3p</b> et <b>miR-146a-5p</b> dans la circulation sanguine Sous expression des <b>miR-182</b> et <b>miR-185</b> dans les cellules bronchiques	<b>Inflammation</b> <b>Pathologies cardiaques:</b> <b>Athérosclérose</b> <b>Cancérogenèse</b>
<b>Cadmium</b>	Augmentation de l'expression des <b>miR-146a</b> dans les leucocytes	<b>Inflammation</b>
<b>HAPs</b>	Augmentation de l'expression des <b>miR-494</b> dans les cellules bronchiques humaines	<b>Survie cellulaire</b>

**Fig.31** : Tableau récapitulatif qui reprend les effets des PM, des métaux et HAP sur les modifications de l'expression de certains miARN avec des exemples de processus cellulaires ciblés.

### 3.3.2.8.8 PM<sub>2.5</sub> et autres mécanismes cellulaires

Les particules exercent un effet sur la signalisation cellulaire initiée par des récepteurs membranaires dont les Récepteurs Tyrosine Kinase parmi lesquels l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) est particulièrement concerné. En effet, l'EGFR induit des réponses de survie, prolifération, motilité, angiogenèse et de résistance à la mort cellulaire dans de nombreux modèles de cellules épithéliales en culture. La dérégulation de l'EGFR est associée à la tumorigenèse, où il est retrouvé muté ou surexprimé dans de nombreux cancers dans les cancers du poumon (Herbst et al., 2002). La fixation de son ligand va induire la dimérisation du récepteur puis l'activation par cascade de phosphorylation des voies Ras/MAPK, PI3K/Akt ou STAT3 qui vont induire l'activation de facteurs de transcription, dont c-jun/c-Fos et favoriser la prolifération ou encore la survie cellulaire (Yarden et al., 2001b ; Schlessinger et al., 2002). Une étude montre que l'exposition de cellules épithéliales bronchiques aux PM<sub>2.5</sub> est associée à l'augmentation de l'expression de certains ligands de l'EGFR dont le TGF- $\alpha$ , l'amphiregulin et l'EGF et que cette augmentation va conduire à des réponses pro-inflammatoires et non pas

de prolifération cellulaire (Rumelhard et al., 2007). Néanmoins, aucun consensus n'a clairement été établi quant au rôle de l'EGFR dans le processus de cancérogenèse pulmonaire induite suite à l'exposition aux particules fines.

Les particules présentent un effet sur la longueur des télomères. Les télomères désignent l'extrémité des chromosomes constitués d'une répétition de séquence (TTAGGG) qui va interagir avec de nombreuses protéines permettant de générer une structure en boucle à l'extrémité des chromosomes et de protéger le génome d'éventuelles cassures, de recombinaisons ou de fusions *end-to-end*. La longueur des télomères va être régulée par l'activité d'une enzyme nommée télomérase qui va venir ajouter la séquence TTAGGG à l'extrémité des chromosomes (Blackburn et al., 1991). Dans les cancers, notamment pulmonaires, un raccourcissement des télomères est décrit et est suivi de l'activation de la télomérase (Fernandez-Garcia et al., 2008). Une étude montre, sur des travailleurs exposés à des PM<sub>2,5</sub> issues de fumées de soudure, que la longueur des télomères des leucocytes est diminuée (Wong et al., 2014). D'autres études montrent également une diminution de la longueur des télomères suite à l'exposition aux PM<sub>2,5</sub> liée à un stress oxydatif important (Hoxha et al., 2009 ; McCracken et al., 2010 ; Grahame and Schlesinger., 2012)

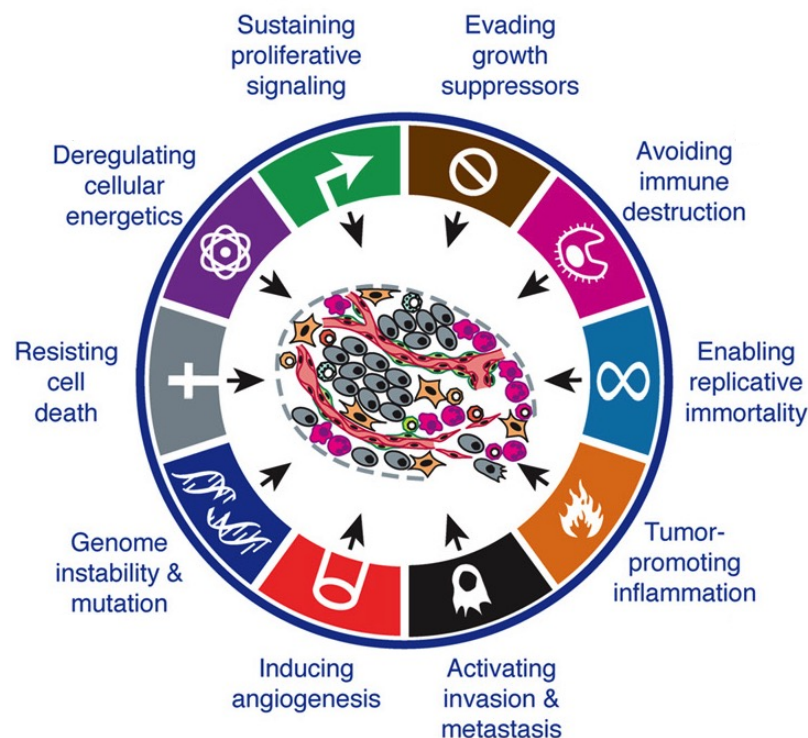
**En conclusion, toutes les études toxicologiques tendent à conclure que les particules fines induisent de l'inflammation, du stress oxydatif ou perturbe le métabolisme des xénobiotiques dans les cellules mais également dans les modèles animaux exposés. Cependant, les études se contredisent et aucun consensus n'est réellement établi concernant la génotoxicité des PM<sub>2,5</sub> ou leurs effets sur les différentes voies de signalisation dont les voies impliquées dans le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Des études récentes, quant à elles, commencent à mettre en avant l'implication des particules fines dans la modification de certains paramètres épigénétiques dont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones ou la surexpression ou répression de certains micro-ARN. Les liens entre l'exposition aux particules fines et la cancérogenèse pulmonaire commencent à être établis mais nécessitent tout de même des études plus approfondies.**

### 3.4 Cancérogénèse pulmonaire et pollution particulaire.

#### 3.4.1 Carcinogénèse et anatomopathologie des cancers bronchopulmonaires

La carcinogénèse est un processus multifactoriel très complexe par lequel une cellule normale va évoluer en cellule cancéreuse. La cellule cancéreuse va perdre des fonctions de régulation permettant d'acquérir des propriétés telles qu'une croissance anarchique ou une résistance à la mort cellulaire (apoptose), favorisant la formation d'une tumeur cancéreuse ou encore d'acquérir des capacités migratoires et/ou invasives, favorisant les processus métastatiques. Cette cellule ne répond donc plus de manière adaptée aux différents signaux environnementaux. D'après Hanahan et Weinberg, six altérations physiologiques essentielles semblent être suffisantes au développement d'un cancer : l'indépendance vis à vis de signaux de croissance, le potentiel répliatif sans limite, la résistance à l'apoptose, l'insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs, l'induction de l'angiogénèse et l'invasion dans d'autres tissus (Hanahan and Weinberg, 2000). Plus récemment ces mêmes auteurs ont ajouté d'autres altérations importantes qui sont : l'instabilité génomique, l'échappement au système immunitaire, la promotion de l'inflammation par la tumeur et la dérégulation du métabolisme énergétique (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces différentes caractéristiques sont retrouvées présentes dans la plupart des tumeurs et sont acquises à la suite d'altérations génomiques (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cellules cancéreuses sont, de plus, davantage sensibles à la mutagenèse (Negrini et al., 2010). En effet, elles sont plus sensibles aux agents mutagènes puisqu'elles présentent généralement des mutations qui compromettent les systèmes impliqués dans le maintien du génome cellulaire ou encore dans l'induction de l'apoptose ou de la sénescence lorsque les cellules sont trop endommagées (Jackson and Bartek, 2009). Certaines altérations sont héritées et d'autres sont induites par des facteurs environnementaux et peuvent être génétiques ou épigénétiques. Les altérations génétiques influent sur la séquence d'ADN, elles peuvent concerner un gène où des mutations sont observées telles que des substitutions de bases par d'autres, des délétions ou des insertions de bases dans la séquence d'ADN. Ces modifications peuvent également concerner des remaniements chromosomiques tels que des translocations, c'est-à-dire des échanges de portion chromosomique entre deux chromosomes ou des cassures chromosomiques. Les altérations épigénétiques sont définies comme les changements qui n'influent pas la séquence codante du génome mais peuvent affecter l'expression des gènes dont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les miRNAs. Des altérations géniques et épigénétiques sont retrouvées dans les différents sous-groupes des Cancers BronchoPulmonaires (CBP).

Les CBP sont regroupés selon des critères histologiques, les carcinomes à petites cellules (CPC) qui représentent environ 13- 20% des cas et sont principalement localisés dans les bronches supérieures et se manifestent suite à la transformation de cellules neuroendocrines (Carney and Minna., 1982 ; Van Meerbeeck et al., 2011). Les carcinomes non à petites cellules (CNPC) qui représentent 85% des cas de CBP dont les carcinomes à grandes cellules localisés dans tout le poumon, les carcinomes épidermoïdes majoritairement dans les grosses bronches et les adénocarcinomes essentiellement situés au niveau du poumon périphérique (Sher et al., 2008).



**Fig.32 :** Principaux mécanismes impliqués dans la cancérogenèse. D’après Hanahan and Weinberg., 2011.

### 3.4.2 Quelques altérations génétiques fréquemment retrouvées dans les CBP.

De nombreuses altérations génétiques sont détectées dans les CBP et ce dépendamment du patient ou encore du type de CBP considéré, cependant certaines altérations sont fréquemment retrouvées dans ces cancers. Le meilleur exemple serait celui des mutations du gène *TP53* où des mutations sont retrouvées dans environ 40-70% des cas de CPC et 40-60% des CNPC (INSERM., 2008). En effet, la protéine TP53, considérée comme le « gardien du génome », est impliquée dans l’arrêt du cycle cellulaire ou dans la mise en place de

l'apoptose des cellules soumises à un stress, elle permet donc de réguler la balance mort/survie des cellules. Cette protéine va favoriser l'activation de la protéine P21<sup>CIP1</sup> et bloquer les cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire. De plus, TP53 va activer des protéines activatrices de l'apoptose telles que BAX et inhiber les protéines inhibitrices de l'apoptose telles que certaines protéines de la famille BCL-2 (Paragraphe 3.3.2.7.2). Des mutations inhibitrices du gène *TP53* ont pour conséquence que les cellules sont capables de proliférer activement et de résister à la mort cellulaire. (Lane., 1992). Un autre inhibiteur du cycle cellulaire, P16<sup>INK4</sup> est retrouvé muté mais également hyperméthylé dans plus de 50% des cas de CNPC (INSERM., 2008). Le gène *P16<sup>INK4</sup>* est un suppresseur de tumeur qui code pour un inhibiteur du cycle cellulaire impliqué dans la phase G1/S. Des mutations inactivatrices conduisent à la répression de ce gène conduisant à la dérégulation du cycle et à la prolifération soutenue des cellules. De plus, la réactivation précoce de l'activité télomérase qui favorise la réplication cellulaire a été mise en évidence dans environ 90% des CPC et 85% des CNPC. Bien d'autres voies sont également dérégulées notamment les voies de signalisation initiées par certains récepteurs tyrosine kinase (RTK) qui sont fortement impliqués dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire, parmi ces récepteurs sont retrouvés; l'EGFR surexprimé dans environ 62% des CNPC et des mutations sont retrouvées dans 10 à 50% des CNPC et ce dépendamment du sexe, de l'âge, de l'ethnie et du statut tabagique (Kosaka et al., 2004 ; Paez et al., 2004) et MET (ou HGFR) qui est surexprimé dans environ 20% des CBP. Des mutations des membres de la famille RAS (HRAS, KRAS, NRAS) sont également rapportées dans 20 à 30% des adénocarcinomes. La protéine Ras est impliquée dans la voie RAS/MAPK et permet d'amplifier des signaux initiés par des RTK dont EGFR et MET qui participent à l'activation de voies de prolifération, survie ou migration (INSERM., 2008). La PI3K est impliquée dans la signalisation cellulaire initiée notamment par les RTK et permet le recrutement et l'activation de protéines dont AKT qui favorise la survie, la prolifération ou encore la migration. Des mutations sur le gène *PIK3AC* qui code pour la sous unité p110 de la PI3K sont retrouvées dans 1 à 3% des CNPC (Samuels et al., 2004)

### 3.4.3 Quelques altérations épigénétiques fréquemment rencontrées dans les CBP.

Les mécanismes génétiques et épigénétiques présentent des interactions mutuelles, en effet, des modifications épigénétiques peuvent conduire à des mutations ponctuelles et à l'inverse des mutations génétiques peuvent perturber le profil de méthylation de l'ADN (Brena

et al., 2007 ; Chan et al., 2008). La méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les miRNAs régulent de nombreux processus biologiques fondamentaux impliqués dans la genèse des cancers.

Les éléments LINE-1 présentent dans les cancers pulmonaires une activité de retro-transposition accrue ce qui augmente l'instabilité génomique. L'hypométhylation globale des régions CpG est fréquemment observée dans les cancers, notamment les cancers pulmonaires ce qui va favoriser les recombinaisons et donc l'instabilité chromosomique (Rauch et al., 2008 ; Daskalos et al., 2009). Les îlots CpG de certains gènes impliqués dans l'apoptose, l'invasion, la réparation de l'ADN présentent une méthylation aberrante qui conduit à la dérégulation de leur expression et les îlots CpG des gènes suppresseurs vont quant à eux être retrouvés hyperméthylés conduisant à la répression de leur transcription (Zöchbauer-Müller et al., 2001). En effet, une augmentation des *DNA Methyltransferase* ou DNMT est associée à une augmentation des cancers pulmonaires et va favoriser la répression de gènes dits suppresseurs de tumeurs qui codent pour des protéines impliquées dans la répression du cycle cellulaire ( $P16^{INK4}$ ), dans l'apoptose (Caspase 8) ou des gènes impliqués dans l'adhésion et l'invasion cellulaire (E-Cadherin ou metalloprotéinase-3) (Brock et al., 2008 ; Damiani et al., 2008). Certains gènes sont retrouvés hyperméthylés notamment dans les CNPC comparés au tissu sains tels que  $P16^{INK4}$ . L'hyperméthylation de  $P16^{INK4}$  conduit à l'inhibition de l'expression de ce gène favorisant la dérégulation du cycle cellulaire et donc la prolifération active des cellules. Le promoteur du gène codant pour la protéine  $P14^{ARF}$  est également retrouvé hyperméthylé. Par conséquent, la protéine  $P14^{ARF}$  qui normalement interagit avec MDM2 afin de stabiliser P53 et de bloquer le cycle cellulaire, ne peut plus, dans les cancers pulmonaires, exercer son rôle d'inhibiteur du cycle cellulaire (voir Fig.23) (INSERM., 2008).

Les modifications des histones sont également associées à la cancérogenèse et peuvent conduire à une compaction de l'ADN et donc une répression de l'expression de certains gènes. Les histones désacétylases ou HDAC sont retrouvées surexprimées dans les cancers et actuellement, une stratégie thérapeutique novatrice basée sur l'inhibition des HDAC est en développement et montre des effets intéressants sur l'induction de l'apoptose (TRAIL, BAX, BAK, APAF-1) ou l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses (Miyanaga et al., 2008). Des modifications de l'histone H4 sont fréquentes dans les cancers pulmonaires avec une hyperacétylation de H4K5/H4K8, une hypoacétylation de H4K12/H4K16, et une perte de la triméthylation de H4K20 (Van Den Broeck et al., 2008). La méthylation de H3K79 et la

déméthylation de H3K4Me3/Me2 sont observées à la fois dans les CNPC et les CPC (Hayami et al., 2010 ; Kim et al., 2012)

Les miRNAs sont impliqués dans l'oncogénèse et présentent une expression altérée même dans les stades les plus précoces de la cancérogenèse pulmonaire. Une étude de Dommem et ses collaborateurs montre, dans les CNPC, une altération de l'expression de 128 miRNAs dont les plus dérégulés, miR-21, miR-106a, miR-126, miR-185, miR-210, and miR-15, présentent un rôle important dans l'angiogénèse (Dommem et al., 2012). Une autre étude démontre la précocité des miRNAs et donc l'importance de trouver des miRNAs spécifiques de certains cancers pulmonaires afin de les utiliser comme outil diagnostique et c'est le cas des miR-28-3p, miR-30c, miR-92a, miR-140-5p, miR-451 et miR-660 qui sont détectés dans le sang de patients ayant un cancer du poumon asymptomatique (Boeri et al., 2011). Shen et ses collaborateurs ont montré que la présence dans le plasma des miR-21, miR-126, miR-210, et miR-486-5p présente une sensibilité de 86% et une spécificité de 96% chez les patients atteints de CNPC comparés à des sujets sains témoins, faisant de ces miRNAs des biomarqueurs précoces potentiels (Shen et al., 2011). L'expression des miR-9-3, miR-34b et miR-126 quant à elle est réprimée suite à leur méthylation, et associée à l'augmentation de l'invasion cellulaire dans les CNPC et est un facteur de mauvais pronostic (Watanabe et al., 2012).

#### 3.4.4 Pollution atmosphérique, cancérigène avérée pour l'homme : composés classés cancérigènes avérés.

Comme présenté au paragraphe 3.2.2.3, la pollution atmosphérique a récemment été classée comme cancérigène avéré pour l'homme (CIRC groupe 1) (CIRC., 2015). En effet, de nombreuses études épidémiologiques réalisées à la fois en Europe, Amérique du nord et Asie et qui comprennent des millions de personnes convergent vers le même résultat, à savoir, une augmentation de la prévalence des cancers pulmonaires associée à l'exposition aux polluants atmosphériques, en incriminant plus particulièrement les particules fines. Bon nombre de ces études ont été effectuées dans des zones où la concentration en PM<sub>2.5</sub> était comprise entre 10 et 30 µg/m<sup>3</sup>, ce qui représente au final un faible niveau d'exposition comparé à d'autres zones, notamment en Chine, où des concentrations proches de 100 µg/m<sup>3</sup> et jusqu'à 400 µg/m<sup>3</sup> peuvent être mesurées (paragraphe 3.3.2.7.2). Les concentrations de 10 et 30 µg/m<sup>3</sup> restent faibles mais suffisantes pour participer à la cancérogenèse pulmonaire. En effet, de manière inquiétante, ces études mettent également l'accent sur une augmentation significative du risque de développer



des cancers pulmonaires dans des zones où la concentration en PM<sub>2,5</sub> est inférieure aux recommandations de l'OMS (Loomis et al., 2013). Les particules diesel ainsi que les fumées de combustion du charbon ou du bois ont précédemment été classées cancérigènes avérés par le CIRC par conséquent leur abondante présence dans l'air extérieur laisse supposer de leur important rôle dans la mise en place des mécanismes conduisant à la cancérogenèse pulmonaire.

De plus, les résultats des études épidémiologiques ont été corroborés par des expériences chez l'animal qui ont confirmé le caractère cancérogène de la pollution atmosphérique, notamment des particules fines. Une ancienne étude, publiée en 1997 dans *Environmental research*, montre que la pollution atmosphérique aurait un effet promoteur de la cancérogenèse. En effet, des souris pré-exposées à l'uréthane, un agent chimique classiquement utilisé pour initier des mécanismes de cancérogenèse chez les rongeurs, présentent une probabilité plus importante de développer des cancers pulmonaires si elles sont ensuite exposées directement à la pollution urbaine. Les souris exposées à la pollution atmosphérique durant une période de six mois et sans traitement préalable à l'uréthane n'ont quant à elles pas développé de cancer, ce qui semble appuyer la théorie selon laquelle la pollution atmosphérique serait un agent promoteur de la cancérogenèse.

Bien que le tabagisme actif reste la cause majeure de l'augmentation de l'incidence des CBP, d'autres facteurs ont également été classés, par le CIRC, cancérigènes avérés ou probables pour l'homme. Parmi ces composés sont retrouvés des HAP ou des métaux qui sont détectés à de faibles concentrations dans les particules fines. Cependant, bien que les concentrations atmosphériques en HAP ou métaux soient faibles, ils contribuent fortement à la toxicologie liée à l'inhalation de la pollution particulaire. Les HAP sont issus de la combustion incomplète de matière organique et sont majoritairement retrouvés dans les fumées de tabac, dans des expositions professionnelles ou dans l'air extérieur ambiant (incinération, moteurs de véhicules, chauffage résidentiel, production d'énergie, etc.). De nombreux HAP présents dans l'air sont cancérigènes et le B(a)P a été classé cancérogène avéré pour l'homme (Groupe 1) (CIRC., 2010). Les éléments traces métalliques sont persistants dans l'environnement et vont s'accumuler dans l'organisme suite à leur inhalation mais également se retrouver dans la chaîne alimentaire suite à leur bioaccumulation notamment dans les plantes ou poissons qui sont ensuite consommés. Parmi les éléments traces métalliques, le Cadmium et ses dérivés (CIRC., 1993), les composés du Nickel (dioxyde, monoxyde de Nickel, sulfure de Nickel, etc) (CIRC., 1990), l'Arsenic et ses composés (CIRC., 1987), le Chrome VI (CIRC., 1990), le chromate et

arséniate de Plomb (CIRC., 1987) ont été classés cancérigènes avérés pour l'homme (groupe 1).

#### 3.4.5 Pollution particulaire et cancérogenèse pulmonaire.

La cancérisation est un processus multi-étapes par lequel les cellules vont subir une instabilité chromosomique, être capables de résister à la mort, de proliférer de manière active, d'acquérir un potentiel répliatif sans limite, capable d'induire l'angiogenèse ainsi que l'invasion cellulaire, etc (Hanahan and Weinberg., 2011). Comme exposé précédemment, de nombreuses études épidémiologiques mettent en avant le lien entre la cancérogenèse pulmonaire et l'exposition aux particules fines. De plus, de nombreuses études toxicologiques démontrent également ce lien et tentent de mettre en lumière les mécanismes qui initient et favorisent la progression tumorale de cellules exposées aux PM<sub>2.5</sub>. L'inflammation et le stress oxydatif sont retrouvés fortement impliqués dans la cancérogenèse pulmonaire mais également suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub>. En effet, l'exposition aux particules fines va favoriser l'inflammation et la production de ROS qui auront pour conséquence de générer des oxydations protéiques, lipidiques ou sur l'ADN favorisant la formation d'adduits à l'ADN et donc l'instabilité génétique. Il est également montré dans certaines études que les PM<sub>2.5</sub> peuvent activer des processus génotoxiques tels que des cassures double brin, l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques et la formation de micronoyaux pouvant conduire à la transformation cellulaire. Cependant, les études s'intéressant au cycle cellulaire et à l'apoptose suite à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> restent controversées puisque des études montrent un blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose alors que d'autres montrent que les particules fines favorisent la progression dans le cycle cellulaire et la résistance à la mort cellulaire. D'autres études sont donc nécessaires à la meilleure compréhension de ces mécanismes. Certaines études montrent l'activation de la voie EGFR qui est fortement impliquée dans de nombreux cancers du poumon mais le lien entre l'activation de cette voie et la prolifération cellulaire n'est pas établi. L'exposition aux PM<sub>2.5</sub> peut induire un raccourcissement des télomères qui est également observé dans certains cancers et peut modifier le potentiel répliatif des cellules or les mécanismes ne sont pas connus. La méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les miRNAs régulent de nombreux processus biologiques fondamentaux impliqués dans la genèse des cancers. De plus, l'exposition aux polluants atmosphériques est associée à la dérégulation de l'épigénome de nombreux gènes impliqués dans la cancérogenèse, ce qui suggère l'existence de liens entre polluants atmosphériques, épigénétique et cancer. En effet, une exposition aux particules

entraîne l'hyperméthylation des promoteurs des gènes P53 et P16 conduit à la répression de ces gènes ce qui peut favoriser l'activation du cycle cellulaire, ces modifications sont de plus fréquemment retrouvées dans les cancers pulmonaires. L'hyperacétylation des histones H3 au niveau des promoteurs des gènes c-jun/c-fos favorise la transcription active de ces gènes et donc l'activation des gènes cibles dont des gènes favorisant la prolifération cellulaire (Martinez-Zamudio et al., 2011). Des modifications des histones, telles que la méthylation de l'histone H3, induisent l'abolition de l'expression du gène *spry2* (Sprouty homologue 2). La protéine Spry2 est un régulateur négatif de nombreux membres de la famille des RTKs qui sont impliqués dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire et fréquemment retrouvés surexprimés dans les cancers pulmonaires, parmi ces récepteurs on retrouve ; l'EGFR ou MET (Martinez-Zamudio et al., 2011). De récentes études ont documenté le rôle des miRNAs, dans la carcinogenèse après exposition aux particules où les miRN-21, miR-126 et miR-185 sont retrouvés dérégulés dans les CNPC et également dans les cellules exposées aux particules. Ainsi, l'exposition aux polluants atmosphériques entraîne des modifications épigénétiques influençant les gènes impliqués dans la prolifération, la survie ou la migration cellulaire. Des liens étroits entre exposition aux particules fines sont mis en avant dans ces dernières études mais ne mettent pas réellement en avant des mécanismes par lesquels les particules fines conduiraient à la cancérisation des cellules.

**Même si les études s'intéressant à la toxicologie des particules tendent à s'étoffer, les mécanismes cellulaires exacts par lesquels les PM<sub>2.5</sub> vont conduire à la cancérisation des cellules pulmonaires ne sont pas encore établis. Des points communs entre les voies impliquées dans la cancérogenèse pulmonaire et les mécanismes décrits dans la toxicologie des particules fines tentent d'être posés afin de mettre en avant des liens entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et l'apparition des cancers du poumon.**

#### **4. Problématique de thèse**

La pollution particulaire représente un réel enjeu de santé publique et son implication dans la cancérogenèse pulmonaire est démontrée par des études épidémiologiques et toxicologiques. Cependant les mécanismes conduisant à la genèse des cancers sont peu décrits et présentent quelques contradictions, liées à l'utilisation de différents modèles cellulaires et différents protocoles d'exposition à des particules dont la composition et les concentrations utilisées diffèrent d'une étude à l'autre.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la physicochimie et la toxicologie des particules fines (PM<sub>2,5</sub>) que nous avons prélevées à Lille au cours de deux saisons contrastées. Les particules ont été prélevées sur le site urbain de Lille au cours de l'automne-hiver 2013/2014 et du printemps-été 2014 de manière journalière et saisonnière et différents paramètres physicochimiques ont été évalués dont la granulométrie, la composition en ions majeurs, en carbone élémentaire et organique, en métaux ou en HAP. Les prélèvements journaliers permettent de mieux identifier les sources (trafic automobile, chauffage ou activités industrielles). Les prélèvements saisonniers permettant d'accumuler de plus grandes quantités de particules sont utilisés pour évaluer les effets toxicologiques de deux aérosols prélevés à différentes périodes et d'essayer de mettre en avant un éventuel effet saisonnier.

Dans cette étude je me suis particulièrement intéressée à la composition métallique des particules fines notamment au travers de la bioaccessibilité des éléments traces métalliques particulières dans des milieux de culture cellulaire et des fluides bronchiques. En effet, bien qu'étant présents en faible quantité dans les PM<sub>2,5</sub>, les éléments traces métalliques peuvent présenter une toxicité non négligeable puisqu'ils contribuent significativement à l'augmentation de la mortalité (Al, Ni, As, Si) et sont impliqués dans la cancérogenèse pulmonaire (As, Cd, Ni, Cr). De plus, les métaux de transition dont le Fe, Cu, Cr, Ni, V ou encore le Co sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les métaux sont également impliqués dans la formation de dommages à l'ADN, jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose et exercent une influence sur le profil de méthylation de l'ADN, sur les modifications des histones et dans l'activation ou répression de certains miRNAs. Les métaux transition sont principalement retrouvés dans les particules fines et ultrafines dont la pénétrance pulmonaire est importante puisqu'ils peuvent atteindre les bronches inférieures et les alvéoles. Une fois situés dans les compartiments pulmonaires profonds, les éléments métalliques peuvent être solubilisés dans les différents fluides pulmonaires et exercer une toxicologie locale, au niveau pulmonaire, ou diffuser dans la circulation systémique et atteindre d'autres organes dont le cœur ou encore le système nerveux central. Par conséquent, l'évaluation de la solubilité ou bioaccessibilité de ces métaux est indispensable à la meilleure compréhension de leurs potentiels effets toxiques au niveau des différents organes ciblés. La bioaccessibilité des métaux est classiquement évaluée dans l'eau ou dans des tampons salins qui tentent de mimer la composition ionique du surfactant pulmonaire. Plus récemment, la solubilité des métaux a été mesurée dans des tampons dont la

composition tend à se rapprocher de plus en plus de celle du surfactant pulmonaire notamment en prenant en considération la présence de certains éléments organiques (lipides ou protéines). Au cours de mon étude, j'ai évalué la bioaccessibilité des métaux particuliers dans un mucus issu de patients atteints de BPCO ce qui permet d'obtenir une solubilisation davantage réaliste. En parallèle de cela, la bioaccessibilité des métaux a été évaluée dans du milieu de culture consommé ou non par des cellules primaires bronchiques humaines. L'objectif de ce travail est de mettre en avant la solubilité des métaux dans ces milieux et de faire varier les paramètres tels que le temps d'incubation ou encore le ratio masse de particules sur volume de milieu (S/L) et d'en évaluer les conséquences toxicologiques.

Une autre partie de mon travail a été consacrée aux analyses toxicologiques. Pour cela, différents paramètres toxicologiques ont été évalués dans des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) issues de sujets sains et de patients atteints de Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstructives (BPCO) traitées par des concentrations faibles de particules. Les cellules de patients BPCO ont été choisies afin d'intégrer une sensibilité préexistante et représentative de la population exposée quotidiennement aux polluants particuliers. Dans les cellules des patients BPCO, qui présentent une inflammation chronique, nous souhaitons évaluer le potentiel que pourraient avoir ces cellules à exacerber ou modifier la réponse cellulaire initiée par les particules inhalées. Les CEBH ont été exposées ou non à l'interface air liquide, de manière réitérée, à des PM<sub>4</sub> (SRM2786) à 5 µg/cm<sup>2</sup> ou à des PM<sub>2.5</sub> prélevées à Lille à 2 ou 10 µg/cm<sup>2</sup>. Les premiers essais réalisés avec les PM<sub>4</sub> ont permis de mettre au point le modèle de culture des CEBH à l'interface air liquide, de vérifier leur état de différenciation et de valider les premiers essais toxicologiques dont la cytotoxicité, l'inflammation, le stress oxydatif et des paramètres épigénétiques. Par la suite, nous avons exposé les CEBH issues de 5 patients sains et 5 patients atteints de BPCO à des PM<sub>2.5</sub> que nous avons directement prélevées en milieu urbain et que nous avons caractérisées chimiquement. Ce nombre de patients nous a permis d'avoir une puissance statistique suffisante et donc de valider les données des différents résultats obtenus. Dans un premier temps, une analyse pangénomique a été réalisée à la fois par l'utilisation de puces à ADN et de puces à micro-ARN. Les puces à ADN ont permis de détecter des modifications d'expression de certains gènes, potentiellement induites par les PM<sub>2.5</sub>, et ce parmi des milliers de gènes candidats. Les puces à micro-ARN ont mesuré des modifications d'expression de certains micro-ARN. En parallèle, des analyses ciblées ont permis d'étudier l'inflammation, le stress oxydatif ou des modifications épigénétiques qui peuvent être induites par l'exposition aux PM<sub>2.5</sub>.

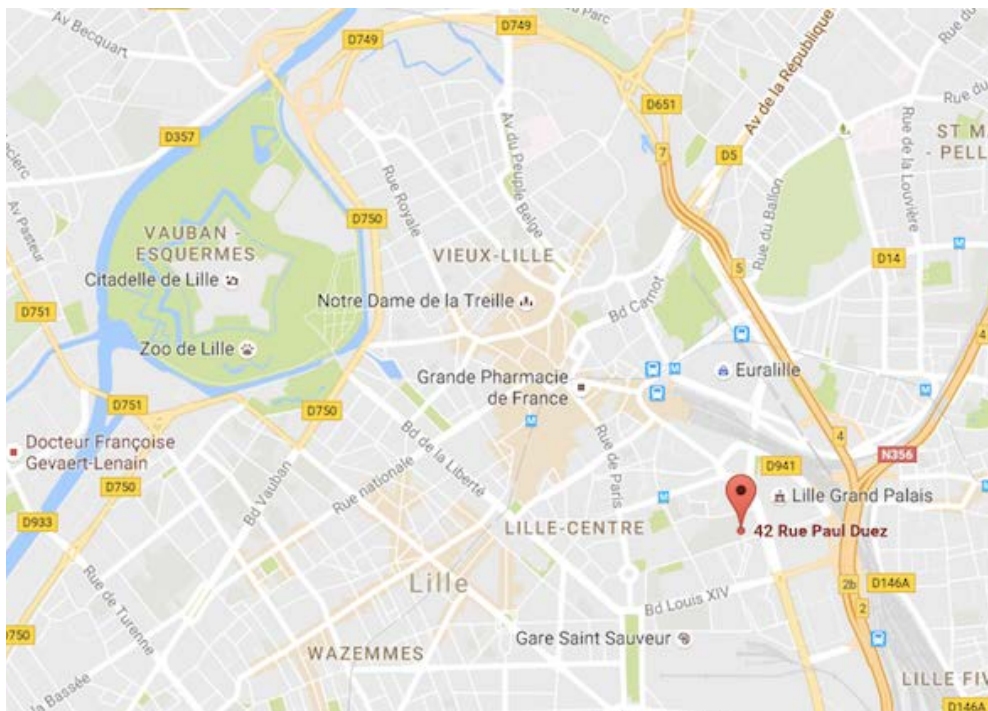
# **CHAPITRE II**

## **MATERIEL ET METHODES**



## 1. Site et méthodologie de prélèvements

Située dans les hauts-de-France, la ville de Lille présente une population de 238 003 selon un recensement de 2013 effectué par l'INSEE et comprend une métropole composée de plus de 1,1 million d'habitants. Le site de prélèvement des particules est situé sur le toit du bâtiment des services centraux de l'université de Lille 2 au 42, rue Paul Duez. Le site se situe en centre ville et est entouré de grands axes routiers dont la N356 et la D941 et des gares Lille Flandres et Lille Europe comme décrit sur la carte ci dessous (Google maps). La ville de Lille connaît d'importants pics de pollution dont les concentrations en  $PM_{2.5}$  excèdent les valeurs exigées par la directive Européenne (2008/EC/50).



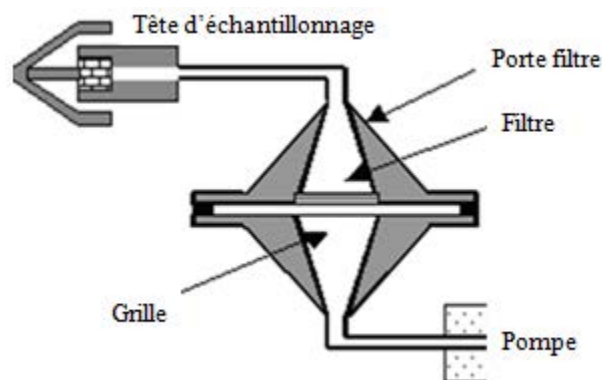
**Fig.33** : Lieu du site de prélèvement d'après Google Maps

## 2. Systèmes de collection des $PM_{2.5}$

- **Le Partisol 2300** (Thermo Scientific) est un préleveur automatique de particules que nous avons fait fonctionner avec un débit de 10L/min avec des filtres de 47 mm de diamètre. Une pompe permet d'aspirer un volume d'air au travers d'une membrane filtrante posée sur un porte-filtre (Métivier et al., 2006). Le système est constitué d'une tête de prélèvement (par exemple :

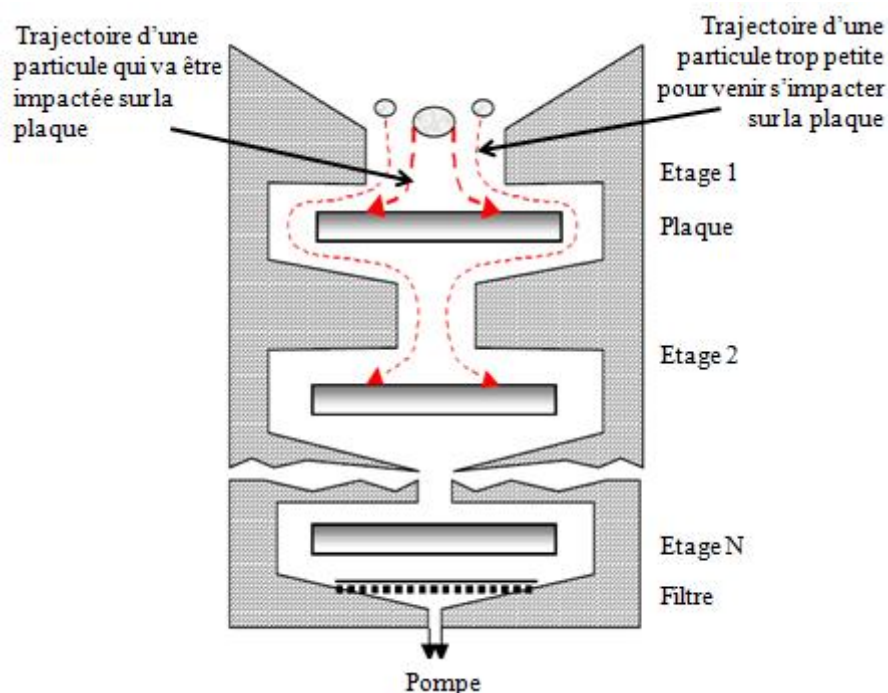


un cyclone) munie d'un dispositif permettant de sélectionner les particules avec un diamètre de coupure spécifique, suivie de filtres collecteurs, dont la nature chimique peut varier suivant les espèces visées (Fig.34) (Rimetz-Planchon, 2008 ; Mirivel, 2009). Les filtres utilisés sont soit des filtres en Quartz (QAT-UP, Pall Corporation) pour l'analyse du carbone élémentaire et du carbone organique (EC, OC) et pour l'analyse des HAP, soit des filtres en PTFE (Zefluor, Pall Corporation) pour les éléments traces métalliques et les analyses d'ions. La méthode de filtration est classiquement utilisée pour effectuer des études physico-chimiques des aérosols et nous avons effectué des prélèvements de PM<sub>2.5</sub> durant 2 saisons automne/hiver 2013 (novembre 2013 à avril 2014) et printemps/été 2014 (Avril à Septembre 2014).



**Fig.34** : Schéma du système de prélèvement par filtration

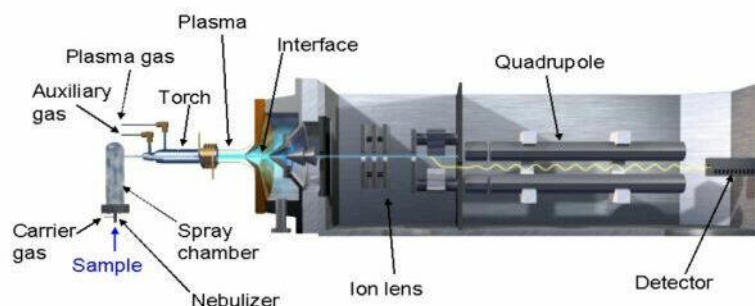
- **L'impacteur en cascade** à haut-débit a été utilisé pour prélever une plus grande quantité de particules que celle prélevée à l'aide du système de filtration qui a servi, dans le cadre de ma thèse, aux essais toxicologiques. L'impaction en cascade repose sur les propriétés aérodynamiques des particules (Wieprecht et al., 2004) où les particules vont venir s'impacter sur des plaques de différents diamètres de coupure en fonction de leur diamètre aérodynamique. Une fois aspirées au travers de la buse, les particules ayant une taille supérieure au diamètre de coupure vont entrer en collision avec la plaque ; les autres, de diamètre plus petit et de vitesse plus élevée, vont donc continuer leur trajectoire jusqu'aux étages inférieurs. Un impacteur en cascade Tisch à 6 étages de 0.39  $\mu\text{m}$  à 10.2  $\mu\text{m}$  a été utilisé avec un débit de 35 m<sup>3</sup>/h pour prélever les PM<sub>2.5</sub> de nos deux campagnes de prélèvements (Fig.35). Chaque étage est couvert de bandes adhésives en téflon afin de transférer facilement les particules avec une pointe de téflon dans un flacon propre de polypropylène préalablement lavé à l'acide. La masse de particules récupérée est ensuite stockée à -20°C.



**Fig.35** : Schéma du principe d'impaction en cascade (Renoux et Boulaud, 1998).

### 3. Principe de l'ICP-MS

L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) combine une ionisation à l'aide d'un plasma avec un spectromètre de masse. La torche à plasma est composée d'Argon à très haute température (6000 à 10000 °C). Les ions ainsi générés sont séparés en fonction de leur masse par un spectromètre de masse quadripolaire et ce en fonction de leur rapport  $m/z$  (masse atomique/charge). L'appareil que nous utilisons est un NexION 300X (Perkin Elmer) et comprend une cellule de collision/réaction utilisant de l'He et de l'H<sub>2</sub> respectivement. Ces cellules permettent d'effectuer des corrections des interférences qui peuvent être isotopiques liées à 2 isotopes de 2 éléments différents qui ont la même masse.. Elles peuvent être polyatomiques, liées à la formation d'oxydes ou dues à la présence d'ions ou de molécules doublement chargés.



**Fig.36** : Schéma de l'interface et du système de mesure d'une ICP-MS

#### 4. Caractérisation chimique des PM<sub>2.5</sub>

Les PM<sub>2.5</sub> ont été manipulées en salle blanche (ou salle propre) pour prévenir à la fois des contaminations biologiques ou par les éléments trace. Trois aliquots (environ 1,2 mg) de PM<sub>2.5</sub> issus des prélèvements saisonniers ont été réalisés pour analyser les concentrations en métaux totaux. Pour cela, les particules ont été digérées dans un mélange de réactifs ultrapurs (Alleman et al., 2010) (8 ml HNO<sub>3</sub>, 0,5 ml HF, 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), à 200 °C, avec un four à micro-ondes (Milestone ETHOS). Les digestions ont été ajustées à un volume final de 50 ml en utilisant de l'eau ultrapure et stockées à 4 ° C jusqu'à analyse. La méthodologie et le contrôle de la qualité des mesures (ébauches, limites de détection, incertitudes) ont déjà été décrites dans Mbengue et al. (2014). Les concentrations de sept éléments majeurs (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na et Si) et une trentaine d'éléments trace (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Hg, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V et Zn) ont été analysés par ICP-AES (IRIS Intrepid, Thermo-scientifique) et ICP- MS (NeXion 300x, Perkin Elmer), respectivement. Chaque échantillon a été analysé en triple exemplaire pour estimer la répétabilité de la technique. Des mesures répétées (tous les 10 échantillons) de blancs et de standard de qualité (QC : Quality Control) ont été réalisées dans la même matrice que les échantillons et ce, au cours de chaque série d'analyses. Un étalon interne (<sup>69</sup>Ga, <sup>103</sup>Rh) a été ajouté (1 pg l<sup>-1</sup>) à toutes les solutions analysées pour corriger la dérive du signal au cours de la session d'analyse à l'ICP-MS. En outre, des échantillons de matériaux de référence certifiés NIST 2584 particules (poussière intérieure) ont été systématiquement utilisés comme matériel de référence pour valider l'ensemble de la procédure d'extraction.

## 5. Bioaccessibilité

Une quantité précise de PM<sub>2.5</sub> (320 µg) a été remise en suspension dans 100 µl de solution physiologique salée qui ont rapidement été transférés dans un tube en polypropylène de 15 ou 30 ml propre contenant un volume déterminé de solution d'extraction (H<sub>2</sub>O, PBS, LHC-9 ou de mucus) afin d'atteindre un ratio solide/liquide (rapport S / L) de 1/6000, 1/21000, 1/50000 ou 1/100000 (en g / ml). Les échantillons ont ensuite été placés dans un incubateur maintenant la température à 37,0 ± 0,5 °C pour simuler la température humaine, sous agitation orbitale pendant 6, 24 ou 72 heures, à une fréquence de 200 tours par minute. La séparation des particules provenant des solutions d'essai a été obtenue par centrifugation pendant 30 min à 5000g et 4 °C. Le surnageant résultant a été rapidement transféré dans un tube en polypropylène de 15 ou 50 ml préalablement acidifié à l'aide de 100 µl d'HNO<sub>3</sub> ultrapure (63% v / v) et stocké à -20 °C jusqu'à l'analyse. La fraction bioaccessible est le rapport de la concentration du métal mesurée dans la solution sur la concentration totale en métal mesurée après digestion complète à l'acide. En variante, la fraction insoluble peut aussi être utilisée pour calculer la bioaccessibilité en fonction des meilleurs résultats analytiques. Cette procédure a été appliquée en parallèle sur des aliquots (environ 1 mg) de SRM 2786 (<4 µm) afin de valider l'ensemble de la procédure pour chaque solution d'extraction. La plupart des éléments mesurés (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn Sr, Ti, Tl, V et Zn) a été validée avec un taux de recouvrement compris entre 85 et 115%. Seuls Ce (65%), La (78%) et Mo (70%) ont présenté des taux de recouvrement plus faibles, probablement en raison de leur faible abondance et de leur spéciation dans les NIST 2786. Cela augmente l'incertitude analytique due aux interférences de ces éléments.

Ces tests ont été effectués sur trois ratios S / L différents (1/6000 ; 1/21000 ; 1/100000) et trois temps de contact entre les PM<sub>2.5</sub> et les solutions (6h, 24h, 72h), afin de simuler les conditions d'exposition généralement effectuées au cours des essais toxicologiques. En raison de la quantité limitée de mucus humain réel disponible, un seul rapport S / L (1/50000) et un temps de contact (72 h) ont été effectués avec ce fluide.

Les surnageants contenant les métaux dissous dans les différentes solutions (eau, PBS, LHC-9, mucus) ont été transférés dans un flacon en polypropylène propre, complété à 50 mL et dilué 10 fois avant d'effectuer les analyses à l'ICP-MS (NeXion 300x, Perkin Elmer). Les résidus des fractions particulières, ainsi que les solutions de mucus ont été totalement digérés dans un four à micro-ondes selon la même procédure que décrite ci-dessus pour les analyses des PM<sub>2.5</sub>.

Après le transfert dans un flacon en polypropylène propre rempli à 50 mL avec de l'eau ultrapure, ils ont été dilués 5 fois avant l'analyse à l'ICP-MS (Mbengue et al, 2014 ; Caboche et al, 2011).

Les concentrations de vingt éléments (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn Sr, Ti, Tl, V et Zn) ont été finalement validées suivant les mêmes étapes que précédemment détaillées pour la caractérisation chimique des PM<sub>2.5</sub>. En outre, un bilan massique des fractions solubles et insolubles a été comparé à la quantité totale de métal mesurée dans ces particules. Le bilan de masse a été validé pour la plupart des éléments avec un taux de récupération atteignant 100 ± 25% pour la plupart des éléments à l'exception de Ba et Fe (100 ± 40%).

### **Cultures primaires des CEBH normales ou BPCO.**

Les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) commerciales proviennent la société Lonza. Des CEBH issues de patients sains ou atteints de BPCO, sont cultivées dans des flasques 75 cm<sup>2</sup> cellbind® (Corning). Les cellules sont cultivées dans du milieu Bronchial Epithelial Cell Growth (BEGM™ ; Bronchial Epithelial BulletKit™, LONZA) supplémenté de BPE (Bovine Pituitary Extract) 0,13 mg/ml, d'hydrocortisone 0,5 µg/ml, d'EGF (Epidermal Growth Factor) 0,5 ng/ml, d'epinephrine 0,5 µg/ml, de transferrine 10 µg/ml, d'insuline 5 µg/ml, de Triiodothyronine 6,5 ng/ml et de Gentamicine/Amphotericine-B 50µg/ml (Fournis par Lonza : SingleQuot Kit) à 37°C et sous une atmosphère contrôlée (5% CO<sub>2</sub>, 95% d'humidité).

### **Culture des CEBH en interface air/liquide.**

Les cellules CEBH issues de patients sains ou atteints de BPCO, sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA (Lonza) etensemencées dans des inserts préalablement recouverts par une solution de collagène (de queue de rat) à 0,03 mg/ml. Elles sontensemencées à 30 000 cellules/cm<sup>2</sup> par insert (Transwell® microplate supports (Corning) avec une épaisseur de membrane de 10µm and un diamètre de pore de 0.4µm) et cultivées dans du milieu B-ALI (Air-Liquid Interface medium, Lonza) supplémenté de BPE (Bovine Pituitary Extract), d'hydrocortisone, d'EGF (Epidermal Growth Factor), d'epinephrine, de transferrine, d'insulin, de Triiodothyronine, d'antibiotiques (Gentamicine/Amphotericine-B) et d'acide rétinolique à

$10^{-7}$  M. 1 mL de milieu B-ALI growth medium complet est ajouté dans l'insert et 2 mL dans le puits. Une fois confluentes, les cellules sont différenciées à l'interface air/liquide pendant trois semaines avec renouvellement du milieu tous les deux jours et ce dans du milieu de différenciation B-ALI (Lonza) reconstitué et supplémenté de façon extemporanée en présence d'un inducteur (Inducer, Lonza). Les cellules dans l'insert ne contiennent pas de milieu et sont en contact avec l'air alors que le puits contient 2 ml de milieu de différenciation.

### **Traitement des cellules aux PM<sub>2.5</sub>.**

A la suite de 3 semaines de différenciation à l'interface air/liquide, les cellules sont ensuite exposées, de façon réitérée (24 et 72h) aux PM<sub>4</sub> (SRM2786) commerciales fournies par le National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) à 5 µg/cm<sup>2</sup> ou 0,1 mg/mL ou à 2 ou 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>2.5</sub> prélevées à Lille au cours de la saison printemps/été 2013 et automne/hiver 2014, par exposition. Avant l'exposition, les particules sont remises en suspension dans une solution saline d'HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco) supplémentée par de la fongisone 1%, puis la solution est homogénéisée aux ultrasons pendant 5 min. Après 24 et 72h de traitement, un aliquot de 1mL de surnageant a été congelé à -80°C et les cellules adhérentes ont été rincées au PBS 1X puis congelées à sec à -80°C.



,

## **CHAPITRE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**





## **1. Article 1 : Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution derived PM<sub>4</sub>**

**Auteurs :** B Leclercq, M Happillon, S Antherieu, E.M Hardy, L.Y Alleman, N Grova, E Perdrix, B.M Appenzeller, J.M Lo Guidice, P Coddeville, G Garçon.

Cet article a été publié dans le journal *Environmental pollution* en septembre 2016

### **Contexte et résultats de l'étude**

La pollution particulaire, bien que sensiblement réduite depuis ces dernières décennies, continue d'exercer des effets néfastes sur la santé publique et favorise des pathologies cardiovasculaires dont le cancer du poumon. La meilleure connaissance des mécanismes par lesquels la pollution particulaire exerce ses effets nocifs sur la santé est indispensable et nécessite des études *in vitro* plus approfondies. Dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions humaines et afin d'intégrer un certain nombre de facteurs liés à la préexistence de pathologies pulmonaires chroniques inflammatoires, nous avons développé des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) et des cellules issues d'un patient atteint de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), cultivées à l'interface air-liquide. Ces cellules saines et pathologiques ont été exposées de façon réitérée (24 et 72h) à des particules PM<sub>4</sub> (SRM2786) à la concentration déterminée comme non-cytotoxique de 5 µg / cm<sup>2</sup>. Nous avons montré par l'étude du statut inflammatoire et oxydatif des cellules saines et des cellules issues du patient atteint de BPCO que les cellules pathologiques conservent leurs caractéristiques physiopathologiques. Nous avons également montré que les deux types cellulaires, et plus particulièrement les cellules pathologiques, présentent une inflammation et un stress oxydatif exacerbés suite à l'exposition aux PM<sub>4</sub> et que cette réponse est d'autant plus forte après 72h de traitement. De plus, les cellules BPCO exposées de manière réitérée vont avoir une faible capacité de métabolisation des HAP dont le benzo[a]pyrène (B[a]P) mais les métabolites des HAP tels que le OH-HAP vont former davantage d'adduits à l'ADN dans ces mêmes cellules. Une diminution de la méthylation globale de l'ADN et l'hyperméthylation du promoteur du gène P16, un raccourcissement des télomères et l'activation de la télomérase sont

observés dans les cellules traitées aux PM<sub>4</sub> et tous ces marqueurs épigénétiques sont d'autant plus dérégulés dans les cellules du patient atteint de BPCO.

Pris ensemble, ces résultats démontrent que les cellules BPCO présentent une réactivité plus importante suite à une exposition répétée à la pollution particulaire. L'utilisation de cultures primaires de cellules à la fois saines et pathologiques et cultivées à l'interface air liquide représente un outil prometteur et qui peut s'avérer très utile dans le domaine de la toxicologie respiratoire.

### **Discussion et perspectives de l'article**

L'originalité de l'étude repose sur l'utilisation de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées à l'interface air liquide (IAL), mais surtout du modèle de cellules issues d'un patient atteint de BPCO. En effet, l'utilisation de cellules BPCO permet de prendre en compte un des facteurs de sensibilité de la population exposée à la pollution de l'air. En effet, il est montré que les patients atteints de BPCO ont un risque plus élevé de développer un cancer du poumon et ce, de manière indépendante au tabagisme (Young et al., 2009). Par conséquent, l'intégration du modèle cellulaire BPCO à notre étude, davantage axée sur la cancérogenèse pulmonaire, est intéressante notamment pour la notion de facteur dit aggravant de la pollution particulaire. De plus, la différenciation des cellules à l'IAL permet de se rapprocher plus encore des conditions humaines. Effectivement, une étude montre que les sécrétions protéiques des CEBH en culture sont identiques aux sécrétions pulmonaires humaines (Kesimer et al. 2009). Aussi, une étude de Ghio et al., 2013 montre que les cellules cultivées à l'IAL et exposées aux particules atmosphériques vont présenter des effets biologiques moins prononcés que les mêmes cellules cultivées en phase immergée. Cependant, pour aller plus loin et nous rapprocher encore plus des véritables conditions d'exposition, il serait intéressant d'utiliser un modèle de culture organotypique bronchique (Bérubé et al., 2010). L'utilisation de ce modèle en co-culture avec d'autres types cellulaires pourrait s'avérer être un outil intéressant pour venir compléter les résultats de toxicologie des PM déjà décrits dans la littérature.

Les particules que nous avons utilisées sont des particules urbaines commerciales caractérisées (SRM2786), prélevées à Prague et fournies par le *national Institute of Standards and Technology* (NIST). Ces particules présentent l'avantage d'être facilement accessibles,

d'être caractérisées en taille et pour un grand nombre de composés dont des HAP, des nitro-HAP, des PBDE et des métaux et d'éviter d'organiser de longues campagnes de prélèvement. Cependant, nous n'en maîtrisons pas les conditions de prélèvement ou de stockage, la liste des composés chimiques caractérisés et nous ne connaissons l'état d'oxydation de ces particules ayant considérablement vieilli. D'où la nécessité d'utiliser des particules fines que nous prélevons et analysons et qui sont conservées peu de temps avant leur utilisation en toxicologie. En outre, les particules fournies sont des PM<sub>4</sub> puisque le Dae moyen est de l'ordre de 4 µm. Au vu de la pénétrance pulmonaire qui varie en fonction du Dae des particules, les essais doivent être validés avec des PM<sub>2.5</sub> qui sont plus représentatives d'une atteinte des bronches profondes voire des alvéoles. De plus, nous avons fait le choix de traiter les cellules à des concentrations relativement faibles de particules au regard de ce qui est fait dans la littérature (Longhin et al., 2013) et d'exposer les cellules de manière réitérée à raison d'une exposition toutes les 24h pendant 24 ou 72h.

Les PM<sub>4</sub> induisent un stress oxydatif important dans les cellules et d'autant plus important dans les cellules BPCO. Cela se traduit par une augmentation des dommages oxydatifs sur les macromolécules dont l'ADN avec la formation de la 8-OHdG, la carbonylation des protéines ou encore l'oxydation lipidique avec la production du dérivé Malondialdéhyde. Ces différentes altérations peuvent conduire à la dérégulation de l'homéostasie cellulaire en favorisant l'instabilité génomique, à la synthèse de protéines altérées suivie de leur perte de fonction ou encore à la perte d'intégrité et de fluidité de la membrane plasmique (Garçon et al., 2006 ; Gualtieri et al., 2010, 2011 ; Dergham et al., 2012, 2015). En étroite relation avec le stress oxydatif, l'inflammation est également augmentée dans les cellules saines et de manière plus marquée dans les cellules pathologiques. L'inflammation induite dans les cellules traitées aux PM<sub>4</sub> se traduit par la production de nombreuses cytokines dont le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 et le GM-CSF. Certains métaux de transition dont le Fe ou le Cu ou des HAP sont impliqués dans la réponse pro-inflammatoire notamment dûe à leur implication dans les réactions de fenton. Le stress oxydatif et l'inflammation sont plus importants dans les cellules BPCO, ce qui confirme leur plus grande sensibilité aux agressions extérieures.

Les cellules BPCO exposées de manière réitérée vont avoir une faible capacité de métabolisation des HAP. En effet, les gènes codants pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phase 1 dont le CYP1A1 ou CYP1B1 sont moins exprimés dans les cellules issues de patients BPCO comparées aux cellules saines. De la même manière, les transcrits des

enzymes impliqués dans la phase 2 du métabolisme des xénobiotiques sont retrouvés plus faiblement dans les cellules BPCO. Cette différence peut s'expliquer par les interconnexions entre AHR et NF- $\kappa$ B qui en plus de moduler la réponse inflammatoire peuvent moduler les voies de signalisation de AHR. Effectivement, l'interaction directe entre AHR et NF- $\kappa$ B entraîne une diminution de l'expression de Cyp1A1 dépendante de AHR (Tian et al., 2009). Par conséquent, le statut inflammatoire plus intense dans les cellules BPCO peut contribuer à expliquer la diminution de l'expression des enzymes impliqués dans les différentes phases du métabolisme des xénobiotiques. Toutefois, il y a une augmentation de la présence des métabolites du B[a]P dont les formes hydroxylées qui forment des adduits à l'ADN. Cette augmentation d'adduits peut se justifier par l'étiologie des BPCO qui est généralement liée à un tabagisme à long terme ce qui fragilise les cellules et affecte leur capacité à se défendre et à réparer des lésions telles que les dommages à l'ADN (Rode et al., 2013). L'exposition aux particules fines peut entraîner des modifications épigénétiques qui peuvent fortement participer à la pathogenèse. L'hypométhylation globale de l'ADN, l'hyperméthylation du promoteur du gène P16, le raccourcissement des télomères, de même que l'activation de la télomérase sont autant de mécanismes retrouvés exacerbés dans les CEBH saines traitées aux PM<sub>4</sub> et de manière plus marquée dans les CEBH-BPCO.

Toutes ces dérégulations vont, en plus du stress oxydatif ou de la formation d'adduits à l'ADN par les OH-HAP, favoriser l'instabilité génomique par la formation de mutations ponctuelles, de translocation, de cassures chromosomiques ou de fusions end-to-end. De plus, ces modifications peuvent favoriser la réplication active ou encore favoriser la progression dans le cycle cellulaire. La mise en place d'une inflammation importante, d'une réplication sans limite, d'une prolifération active, de l'instabilité génomique sont autant de signaux mesurés dans nos cellules CEBH saines ou BPCO traitées aux PM<sub>4</sub> et également fréquemment retrouvés dérégulés dans les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Néanmoins, le lien entre cancer et exposition aux PM<sub>4</sub> n'est pas clairement établi et nécessite davantage de preuves expérimentales. En effet, il serait intéressant d'évaluer le potentiel proliférateur des cellules et la balance mort/survie afin de valider que ce qui est observé au niveau génomique se traduit au niveau phénotypique.

# DIFFERENTIAL RESPONSES OF HEALTHY AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASED HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS REPEATEDLY EXPOSED TO AIR POLLUTION-DERIVED PM<sub>4</sub>

LECLERCQ B<sup>1,2</sup>, HAPILLON M<sup>1</sup>, ANThERIEU S<sup>1</sup>, HARDY EM<sup>3</sup>, ALLEMAN LY<sup>2</sup>, GROVA N<sup>3</sup>, PERDRIX E<sup>2</sup>, APPENZELLER BM<sup>3</sup>, LO GUIDICE J-M<sup>1</sup>, CODDEVILLE P<sup>2</sup>, GARÇON G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, FRANCE

<sup>2</sup> Mines de Douai, SAGE, CS10838, F-59508 Douai, FRANCE

<sup>3</sup> Human Biomonitoring Research Unit, Luxembourg Institute of Health, L-4354 Esch-sur-Alzette, LUXEMBOURG

**Corresponding Author:** Pr Guillaume GARÇON, EA4483, Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse, BP83 59006 Lille Cedex, France. Tél: +33-362283030; E-mail: guillaume.garcon@univ-lille2.fr

## ABSTRACT

While the knowledge of the underlying mechanisms by which air pollution-derived particulate matter (PM) exerts its harmful health effects is still incomplete, detailed *in vitro* studies are highly needed. With the aim of getting closer to the human *in vivo* conditions and better integrating a number of factors related to pre-existing chronic pulmonary inflammatory, we sought to develop primary cultures of normal human bronchial epithelial (NHBE) cells and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, grown at air-liquid interface. Pan-cytokeratin and MUC5AC immunostaining confirmed the specific cell-types of both these healthy and diseased cell models and showed they are closed to human bronchial epithelia. Thereafter, healthy and diseased cells were repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub> at the non-cytotoxic concentration of 5µg/cm<sup>2</sup>. The differences between the oxidative and inflammatory states in non-exposed NHBE and COPD-DHBE cells indicated that diseased cells conserved their specific physiopathological characteristics. Increases in both oxidative damage and cytokine secretion were reported in repeatedly exposed NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells. Diseased cells repeatedly exposed had lower capacities to metabolize the organic chemicals-coated onto the air-pollution-derived PM<sub>4</sub>, such as benzo[a]pyrene (B[a]P), but showed higher sensibility to the formation of OH-B[a]P DNA adducts, because their diseased state possibly affected their defenses. Differential profiles of epigenetic hallmarks (i.e., global DNA hypomethylation, *P16* promoter hypermethylation, telomere length shortening, telomerase activation, and histone H3 modifications) occurred in repeatedly exposed NHBE and particularly in COPD-DHBE cells. Taken together, these results closely supported the highest responsiveness of COPD-DHBE cells to a repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. The use of these innovative *in vitro* exposure systems such as NHBE and COPD-DHBE cells could therefore be consider as a very useful and powerful promising tool in the field of the respiratory toxicology, taking into account sensitive individuals.

**CAPSULE:** Usefulness of healthy and diseased human bronchial epithelial cell models to better evaluate the adverse effects induced by repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub>, considering the sensitive individuals

**KEYWORDS:** air pollution-derived PM<sub>4</sub>; human bronchial epithelial cells; healthy cell model; chronic obstructive pulmonary diseased cell model; sensitive individuals; underlying mechanisms of toxicity

## INTRODUCTION

Air pollution, significantly reduced in recent decades, continues to exert adverse effects on human health. Indeed, in 2012, the world health organization (WHO) reported around 7 million deaths directly linked to air pollution exposure which represents one in eight of total global deaths. These finding has more than doubled previous estimates and confirms that air pollution represents now the world's largest environmental health risk (WHO, 2014). In addition, the general population can be affected by all these health effects whether it be indoor or outdoor air exposition, even at a relative low concentration (Kim et al., 2015). Among air pollutants, particulate matter (PM) is a major health risk factor and is responsible for 3.7 million premature deaths, through the induction of cardiopulmonary diseases and lung cancers (Beelen et al., 2013; Hamra et al., 2014; Pope, 2014; Raaschou-Nielsen et al., 2013; WHO 2014). Recently, the international agency for research on cancer (IARC) classified outdoor air pollution, and particularly PM, as a human carcinogen (group 1) (Loomis et al., 2013). Although most lung cancers can be attributed to direct inhalation of tobacco smoke, about one quarter of lung-cancer cases worldwide occurred in people, who have never smoked. Several factors, genetic but also environmental such as PM, may be the cause of these lung cancers among non-smoking people (Brody, 2014). Moreover, To et al. (2016) reported that individuals exposed to higher levels of air pollution had nearly 3-fold greater odds of developing asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap syndrome. However, despite the international research effort, the knowledge of the underlying mechanisms by which air pollution-derived PM exerts its harmful health effects worldwide is still incomplete and detailed *in vitro* studies are therefore, highly needed.

Better understanding of the underlying mechanisms involved in the pathogenicity of lung cancers related to air pollution-derived PM is still essential and generally relies on three principal categories of lung models (i.e., animal models, *ex vivo* organotypic cultures, and *in vitro* cell culture) (Bérubé et al., 2009). Novel tissue-engineering tools that have been recently developed to help in recapturing the native lung environment *ex vivo*, are available for all the major areas of the respiratory tract. However, clinical and basic science applications have mainly focused on the bronchial epithelium, given that numerous pathologies result from disruption of this region (Bérubé et al., 2010; Boubilil et al., 2013; Pillai et al., 2015). Indeed, the entire respiratory tree is lined by a continuous layer of epithelial cells that are vital for maintaining the normal functions of the respiratory system. This epithelium forms a barrier to various insults, assuring the pulmonary clearance by facilitating mucociliary clearance or by the secretion of protective substances (e.g., surfactant proteins, mucus and antimicrobial peptides). This facilitates the repairing, regeneration and response modulation of other airway components such as smooth muscle or inflammatory cells (Bérubé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2015; Pillai et al., 2015). Despite such efficient defense systems, the airway epithelium is frequently injured due to permanent contact with the external environment, and the generated lesions vary from loss of surface impermeability due to opening of tight junctions, to shedding of the epithelium. These typical alterations in structure and function play a major role in the pathogenesis of numerous respiratory diseases, such as chronic bronchitis, asthma, COPD or cystic fibrosis (CF), and can originate from everyday exposure to pulmonary inhalants such as particles, fibers or chemical materials (Pillai et al., 2015). Immediately after injury, the airway epithelium initiates a repair process to restore barrier integrity and functional regeneration but these processes are still not fully understood (Bérubé et al., 2010; Boubilil et al., 2013; Longhin et al., 2016).

A large part of the toxicological studies that are interesting in air pollution-derived PM are generally performed on cell lines, which are transformed to enable indefinite proliferation. These immortalized cell lines provide the researcher with an almost limitless source of material. However, the pertinence of the data produced is not ensured, with the suggestion that some historical cell lines may not be the cell type originally reported (Bérubé et al., 2010). Moreover, the response of immortalized and primary cells to a same chemical can be markedly different. For instance, Balharry et al. (2008) worked with primary normal human bronchial epithelial cells (NHBE) and discovered that these *in vitro* cultures were anywhere from ten to one hundred times more toxicologically resistant to certain tobacco smoke chemicals, when compared to common lung cell lines. Consequently, using a more relevant *in vitro* model such as the primary cells is critical to the better understanding of toxicological mechanisms related to the exposure to air pollution-derived PM (Bérubé et al., 2009; Boubilil et al., 2013; Courcot et al., 2012; Klein et al., 2011; Pillai et al., 2015).

Several bronchial epithelial cell models have been cultured at an air-liquid interface (ALI), and differences in cell morphology, biochemistry or response to test materials were observed, compared to submerged cultures. Indeed, Ghio et al. (2013) reported that growth of NHBE cells at ALI is associated with a diminished biological effect following exposure to particles, as compared to submerged cells. The use of ALI cultures offers a unique opportunity for the direct deposition of air pollution-derived PM onto the semi-dry apical cell surfaces, a situation that mimics the deposition of particles onto the lung surface *in vivo*. This model maintains disease phenotypes observed *in vivo* when diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells are cultured from patients with CF, COPD, or asthma (Burgel et al., 2011; Davies et al., 2009; Freihsat et al., 2011; Kesimer et al., 2009; Regamey et al., 2011). Accordingly, Freihsat et al. (2011) demonstrated that *in vitro* differentiated NHBE cells secreted cytokines basally after wounding, and that specific cytokines levels were increased in diseased epithelia.

Moreover, recent proteomic analysis of *in vitro* NHBE and human lung apical secretions were similar in identity and quantity to those found in *in vivo* samples (Kesimer et al., 2009).

Clinical, epidemiological and toxicological studies on *in vitro* cell systems have progressively provided a better understanding of the underlying mechanisms induced by air pollution-derived PM. With the aim of getting closer to the human *in vivo* conditions, we sought to develop a primary culture model of human bronchial epithelial cells from healthy subjects (i.e., NHBE) and patients suffering from COPD (i.e., COPD-DHBE), with the cells being grown at the ALI. This innovative model integrates a number of factors related to pre-existing chronic pulmonary inflammatory and also allows us to obtain a differentiation state, as close as possible, to the cellular exposure conditions observed *in vivo*. In addition, we used an original experimental strategy of repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> (i.e., SRM2786, also called fine particulate matter, national institute of standards and technology, NIST) and studied some relevant toxicological endpoints. We already showed that, after single short-term exposure of lung cell lines to air pollution-derived PM, oxidative stress, inflammation, mutagenicity/genotoxicity, and cell cycle alterations were the main adverse cell outcomes (Abbas et al., 2009; 2010, 2013, 2016; André et al., 2010; Billet et al., 2007, 2008; Dagher et al., 2005, 2006, 2007; Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Lepers et al., 2014; Saint-Georges et al., 2008, 2009). All these processes have an important role in eliciting air pollution-derived PM induced lung diseases, such as asthma, allergy, COPD, and cancer but multiple different molecular pathways can be involved. Accumulating evidences from our above-mentioned works revealed that the fine fraction of the PM, is mainly composed of combustion-derived particles with a high redox capacity and with a relatively high levels of organic (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) and inorganic (e.g., metals) chemicals, which are mainly responsible for the reported health effects. Hence, in this work, after having checking the effective differentiation of NHBE and COPD-DHBE cells at ALI, we first studied the cytotoxicity caused by the repeated exposure of NHBE and COPD-DHBE cells to PM<sub>4</sub>. Attention was thereafter focused on the respective ability of PM<sub>4</sub> to induce prooxidative and/or proinflammatory endpoints in repeatedly exposed NHBE and COPD-DHBE cells, through the determination of lipid peroxidation (i.e., production of malondialdehyde, MDA), protein alteration (i.e., carbonylated protein, protein-CO), DNA damage (i.e., production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG), antioxidant capacity (i.e., total antioxidant status, TAS), antioxidant enzyme activity (i.e., superoxide dismutase, SOD), and glutathione status alteration (i.e. glutathione disulfide/reduced glutathione, [GSSG]/[GSH]). The course of the proinflammatory response was characterized by measuring the release of different proinflammatory cytokines (i.e., tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ; interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ ; interleukin-6, IL-6; interleukin-8, IL-8; granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF; transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ). Moreover, the capacity of NHBE and COPD-DHBE cells to metabolize some organic compounds (e.g., PAHs)-coated onto PM<sub>4</sub> was studied both through the evaluation of xenobiotic-metabolizing enzyme (XME) gene expression and the determination of some benzo[a]pyrene (B[a]P) metabolites and OH-B[a]P DNA adducts. While accumulating evidence recently supports the hypothesis that epigenetic alterations could alter the normal cell cycle regulation, we also studied some epigenetic events (e.g. DNA methylation, telomere length and telomerase activity, and histone H3 modifications) in PM<sub>4</sub>-repeatedly exposed NHBE and COPD-DHBE cell models (Guil and Esteller. 2009; Oh et al., 2011; Prescott et al., 2012). Taken all these factors together, using relevant NHBE and COPD-DHBE cell models grown at ALI, these innovative results will highly participate for the better understanding of air pollution-derived PM health effects.



## MATERIALS AND METHODS

### CHEMICALS

Air pollution-derived PM<sub>4</sub> (i.e., SRM2786, also called fine particulate matter: mean particle diameter = 2.8µm) was purchased from the national institute of standards and technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) provided. NHBE and COPD-DHBE cells and culture reagents were provided by LONZA (Verviers, Belgium). Chemicals, SOD determination kit, and Imprint™ Methylated DNA Quantification kit were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability was from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). Goat polyclonal anti-mouse antibody Alexa Fluor® 488 conjugate, Vybrant Cytotoxicity Assay Kit, SlowFade® Gold Antifade Mountant with DAPI, and molecular biology reagents were from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Merck-Millipore (St Quentin-en-Yvelines, France) provided mouse monoclonal anti-human pan cytokeratin (clone PU5), mouse monoclonal anti-human MUC5AC (clone CLH2), MILLIPLIX® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay, CpGenome Direct Prep Bisulfite Modification Kit, CpG WIZ® P16 Amplification Kit, and TRAPeZe® RT Telomerase Detection Kit. RNeasy Mini Kits were from Qiagen (Courtaboeuf, France). Highly Sensitive 8-OHdG Check was from Gentaur France SARL (Paris, France), Histone Purification Mini Kit and Histone H3 PTM Multiplex Assay were from Active Motif (La Hulpe, Belgium).

### METHODS

#### NHBE and COPD-DHBE cell culture and PM<sub>4</sub>-exposure

NHBE and COPD-DHBE cells (LONZA) were respectively established from cells only isolated from a sole healthy or diseased donor. Cells were cultured in 95% humidified air with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in 75cm<sup>2</sup> CellBIND® surface plastic flasks (Corning; Sigma-Aldrich), in bronchial epithelial cell basal medium supplemented with 0.4% bovine pituitary extract, 0.1% (v/v) hydrocortisone, 0.1% (v/v) human recombinant epidermal growth factor 0.1% (v/v) epinephrine, 0.1% (v/v) insulin, 0.1% (v/v) triiodothyronine, 0.1% (v/v) transferrin, 0.1% (v/v) gentamicin sulfate, and, 0.1% (v/v) retinoic acid, also called bronchial epithelial growth medium (BEGM™; Bronchial Epithelial BulletKit™, LONZA). Healthy and diseased cells were seeded at 30,000 cells/cm<sup>2</sup> on Transwell® polyester permeable membrane cell culture 24 mm inserts in 6-well Transwell® microplate supports (Corning). Permeable membrane inserts we used were a treated-polyester tissue with a membrane thickness of 10µm and a pore size of 0.4µm. Once cells had reached confluency, ALI conditions were established by replacing the medium by a bronchial air liquid interface medium supplemented as mentioned above with the addition of 0.2% (v/v) B-ALI™ inducer, also called bronchial air liquid interface differentiation medium (B-ALI™; B-ALI BulletKit™, LONZA). B-ALI™ BulletKit™ is reported as promoting full differentiation of the airway epithelium expressed by the formation of a polarized epithelium with a good barrier function (i.e., transepithelial resistance), secretory phenotype (i.e., mucin secretion), and ciliogenesis. Thereafter, NHBE and COPD-DHBE cells were exposed at ALI one or three times, for 4h, at 24h intervals, as negative controls (i.e., sterile HBSS, 500µL) or PM<sub>4</sub>-exposed cells (i.e., concentrations ranging from 1 to 20µg PM<sub>4</sub>/cm<sup>2</sup>, suspended in sterile HBSS, 500µL). Just before cell exposure, air pollution-derived PM<sub>4</sub> (i.e., SRM2786) were suspended at concentrations ranging from 2 to 40µg/mL in sterile HBSS supplemented with amphotericin B (20µg/mL) at 2% (v/v), and thereafter sonicated for 2 x 1 min. Twenty-four hours after exposure, 1 mL-aliquots of cell-free culture media were collected and quickly frozen at -80°C until the further study of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and proinflammatory cytokines. Adherent cells were washed once with 1mL-aliquots of cold sterile PBS, and quickly frozen at -80°C until the further study of the other toxicological endpoints.

#### Immunocytochemistry

NHBE and COPD-DHBE cells were fixed with 1% (v/v) paraformaldehyde for 3 min at 37°C and then methanol at -20°C for 5 min. Thereafter, they were permeabilized for 3 min with 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS, rinsed three times for 5 min in PBS, and incubated for 1h at 37°C with primary antibodies diluted in 3% (v/v) BSA/0.05% (v/v) Tween, and 0.08% (v/v) sodium azide in PBS at the indicated concentrations (i.e., mouse monoclonal anti-human pan cytokeratin and mouse monoclonal anti-human MUC5A, respectively diluted at 1/100 and 1/250, Merck Millipore). Cells were rinsed three times for 5 min in PBS and incubated for 30 min at 37°C with a goat polyclonal anti-mouse antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate diluted at 1/400 in 3% (v/v) BSA/0.05% (v/v) Tween, and 0.08% (v/v) sodium azide in PBS. Cell cultures were mounted with SlowFade® Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies) and images were acquired on an EVOS™ FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

### **Toxicological endpoints**

Twenty-four hours after the last exposure, cytotoxicity in NHBE and COPD-DHBE cells was evaluated through the determination of ATP concentration (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability, Promega) in cells and extracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity (Vybrant Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) in cell-free culture media. The further study of the toxicological endpoints needed the preparation of different cell lysates: (i) MDA and glutathione status (i.e., GSSG/GSH) were studied after cell lysis with 10% (v/v) cold metaphosphoric acid, (ii) Protein-CO, TAS, SOD, B[a]P and its metabolites, OH-B[a]P DNA adducts, and histone H3 modifications were studied after cell lysis with RIPA buffer (Sigma-Aldrich), (iii) 8-OHdG, global DNA methylation, P16 promoter methylation, and telomere length were studied after DNA extraction with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), (iv) gene expression was studied after total RNA extraction with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and (v) telomerase activity was studied after cell lysis with CHAPS buffer (Sigma-Aldrich). MDA concentration and glutathione status (i.e., GSSG/GSH) were studied in cell lysates using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, as published elsewhere (Diémé et al., 2011; Diouf et al., 2006; Garçon et al., 2000). OxiSelect™ protein carbonyl ELISA Kit (Cellbiolabs) was used to study protein carbonyl derivatives of Pro, Arg, Lys, Thr after the derivatization of the carbonyl group with dinitrophenylhydrazine (Devos et al., 2014). Oxidative DNA adduct 8-OHdG concentration was studied using a commercially available enzyme immunoassay (Highly Sensitive 8-OHdG Check, Gentaur France SARL), as published elsewhere (Dergham et al., 2015). TAS was evaluated according to the method described by Erel et al. (2004). SOD activity was carried out using a commercially available kit (SOD determination kit, Sigma-Aldrich) as described by Kouassi et al. (2010). Cytokine concentrations (i.e., TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, and TGF- $\alpha$ ) in cell-free culture media were determined using a MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay (Merck-Millipore) (Blasco et al., 2016). XME gene expression was studied in cell lysates as published elsewhere (Courcot et al., 2012). Briefly, total RNAs were isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). After the reverse transcription of 2 $\mu$ g of total RNAs in single-stranded cDNAs using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, gene expression relative quantitation was carried out using custom TaqMan TLDA, a 7900HT Real-Time PCR System, and the Expression Suite Software (Thermo). The methods developed for the analysis of PAHs and their OH-metabolites in cell lysates, on the one hand, and for the analysis of 4 tetrahydroxylated-B[a]P isomers released from cell DNA hydrolysis in acidic conditions, on the other hand, were based upon gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and have been adapted from Grova et al. (2011, 2014, 2016). All these analyses were carried out with an Agilent 7890A GC equipped with an HP-5MS capillary column (30m, 0.25mm i.d., 0.25 $\mu$ m film thickness), coupled with an Agilent 7000B triple quadrupole mass spectrometer operating in electron impact ionization mode, and an Agilent CTC PAL autosampler. The Imprint™ Methylated DNA Quantification technology provided a measure of global DNA methylation shifts in NHBE and COPD-DHBE cells (Sigma-Aldrich). The CpGenome Direct Prep Bisulfite Modification Kit provided bisulfite conversion and the CpG WIZ® P16 Amplification Kit was used for determining the methylation status of the P16 gene promoter by methylation-specific PCR (Merck-Millipore). Telomere length was studied using monochrome multiplex quantitative PCR method, as published elsewhere (Cawthon et al., 2009). Telomerase activity was studied using the TRAPEze® RT Telomerase Detection Kit, (Merck-Millipore). Active Motif's Histone Purification Mini Kit was used to purify core histones (i.e., H2A, H2B, H3, and H4) as one total population while preserving their post-translational modifications, and specific H3 modifications (i.e., H3K9ac, H3K4me, H3K27me2, and H3K27me3) were studied by using Histone H3 PTM Multiplex Assay (Active Motif).

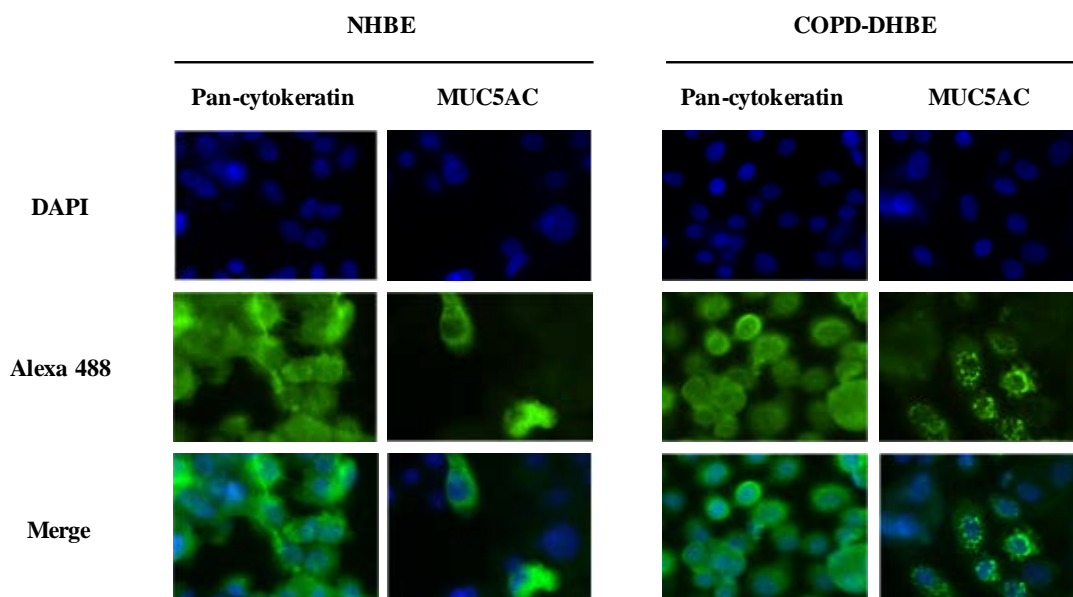
### **Statistical analysis**

Cytotoxicity data were analyzed with the GraphPad Prism6 Software (v6.01) (GraphPadSoftware Inc., USA). Other toxicological endpoints from NHBE and COPD-DHBE cells exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub> were compared with those from negative controls (i.e., sterile HBSS) using the Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons. Statistical analyses were realized with the IBM SPSS Software (v20) (IBM SPSS Software, Inc., USA). Statistically significant differences were reported with *p* values <0.05.

## RESULTS

### NHBE and COPD-DHBE cells differentiation

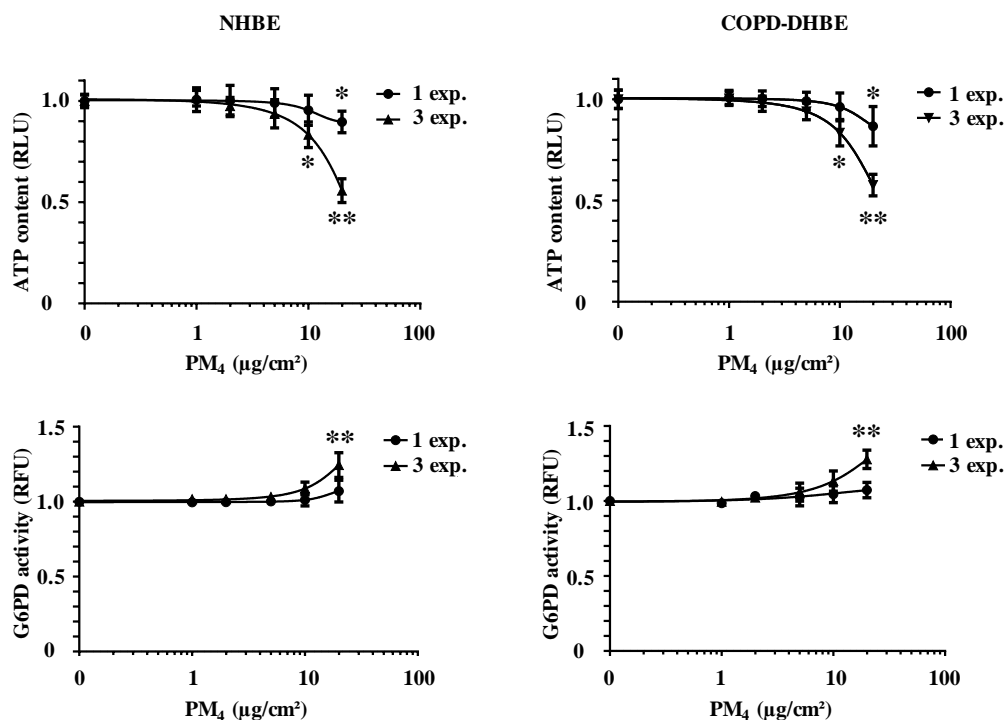
Immunofluorescence labelling of an epithelial characteristic group of proteins, pan-cytokeratin, and a mucin, which represents one of the major lung mucus component, MUC5AC, was carried out in order to check the cell-type of NHBE and COPD-DHBE cells into bronchial epithelia 21-days after their differentiation at ALI (Figure 1). Cytokeratin protein expression within NHBE and COPD-DHBE cells supported their epithelial cell-types. Secretion of MUC5AC in NHBE and COPD-DHBE cells appeared to show that NHBE contain few mucus-producing cells, whereas COPD-DHBE seemed to have an elevated number of goblet cells, which could be coupled with an excessive mucus production.



**Figure 1:** Pan cytokeratin and MUC5AC Immunostaining of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells differentiated for 21 days at the air-liquid interface (ALI). Nuclei are revealed in blue with DAPI. Observations were performed with an EVOS™ FL Cell Imaging System (magnification: x400).

### Cytotoxicity-induced by PM<sub>4</sub> exposure in NHBE and COPD-DHBE cells

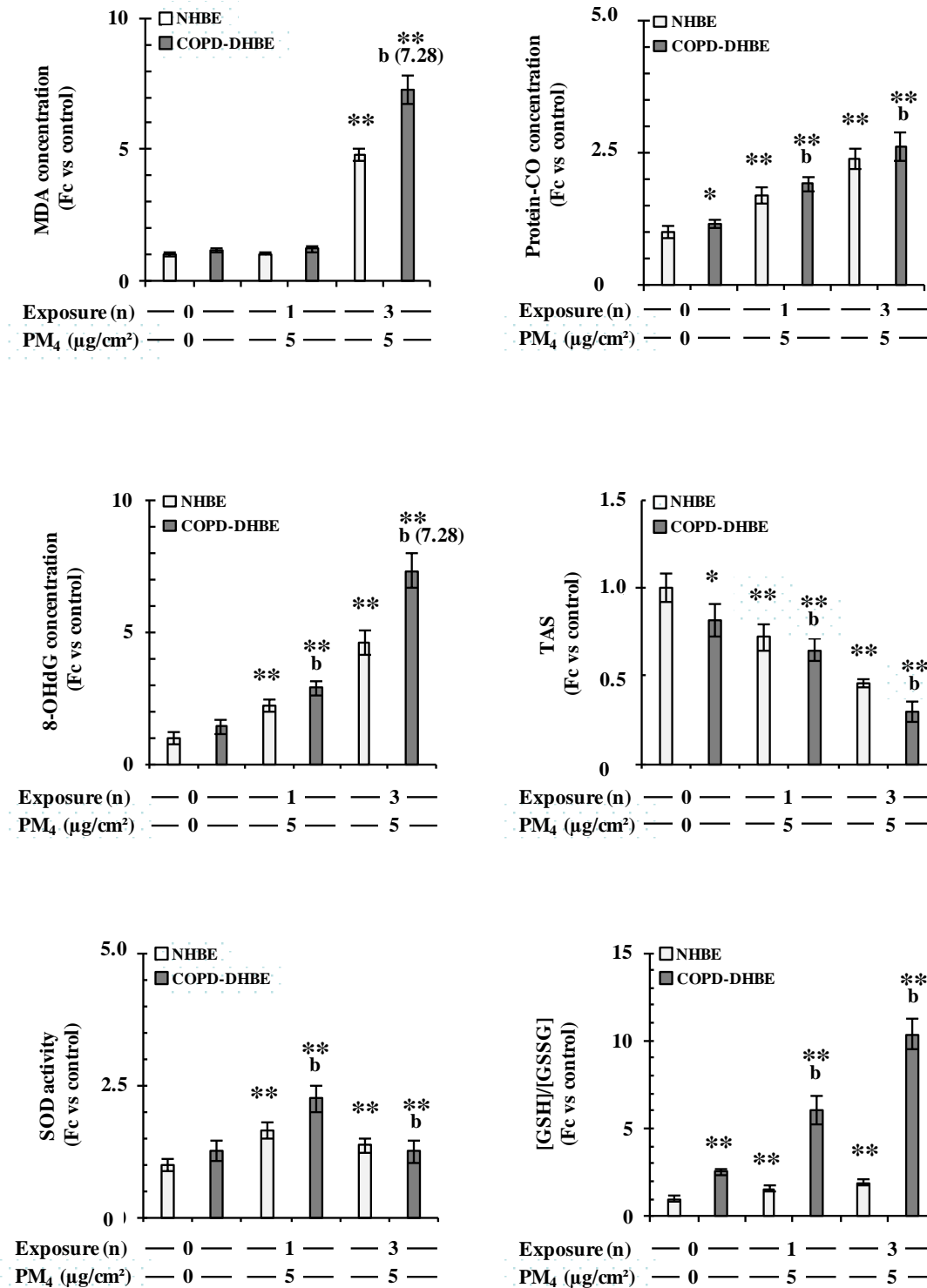
Air pollution derived-PM<sub>4</sub> exposure induced dose- and time-dependent decreases of ATP concentration in NHBE and COPD-DHBE cells, as shown in Figure 2. A statistically significant decreases of ATP concentration was observed only after one exposure to PM<sub>4</sub> at its highest concentration (i.e., 20µg/cm<sup>2</sup>). After three exposures to PM<sub>4</sub>, the ATP decline started at an earlier stage (i.e., 10µg/cm<sup>2</sup>) and diminished more quickly (i.e., 20µg/cm<sup>2</sup>; p<0.05). Moreover, statistically significant releases of G6PD activity were reported only after three exposures to PM<sub>4</sub> at its highest concentration (i.e., 20µg/cm<sup>2</sup>; p<0.01) (Figure 2). There was also no difference between the cytotoxicity reported in NHBE and COPD-DHBE cells after their repeated exposure to PM<sub>4</sub>, even at the highest doses we tested, thereby suggesting the use of 5µg PM<sub>4</sub>/cm<sup>2</sup> as a non-cytotoxic dose of air pollution-derived PM<sub>4</sub> to apply for the further study of the toxicological endpoints.



**Figure 2:** Normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells were grown and thereafter differentiated for 21 days at air-liquid interface. ATP concentration and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) release in cell-free culture media, were measured 24h after one or three exposures for 4h at 24h intervals to increasing concentrations (i.e., ranging from 1 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of air-pollution-derived  $\text{PM}_{10}$ . Values are depicted as means and standard deviations (i.e.,  $n = 6$ ). (Mann-Whitney U test, with  $p$  value correction for multiple comparisons; versus NHBE or COPD-DHBE controls: \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

### Oxidative stress-induced by $\text{PM}_{10}$ exposure in NHBE and COPD-DHBE cells

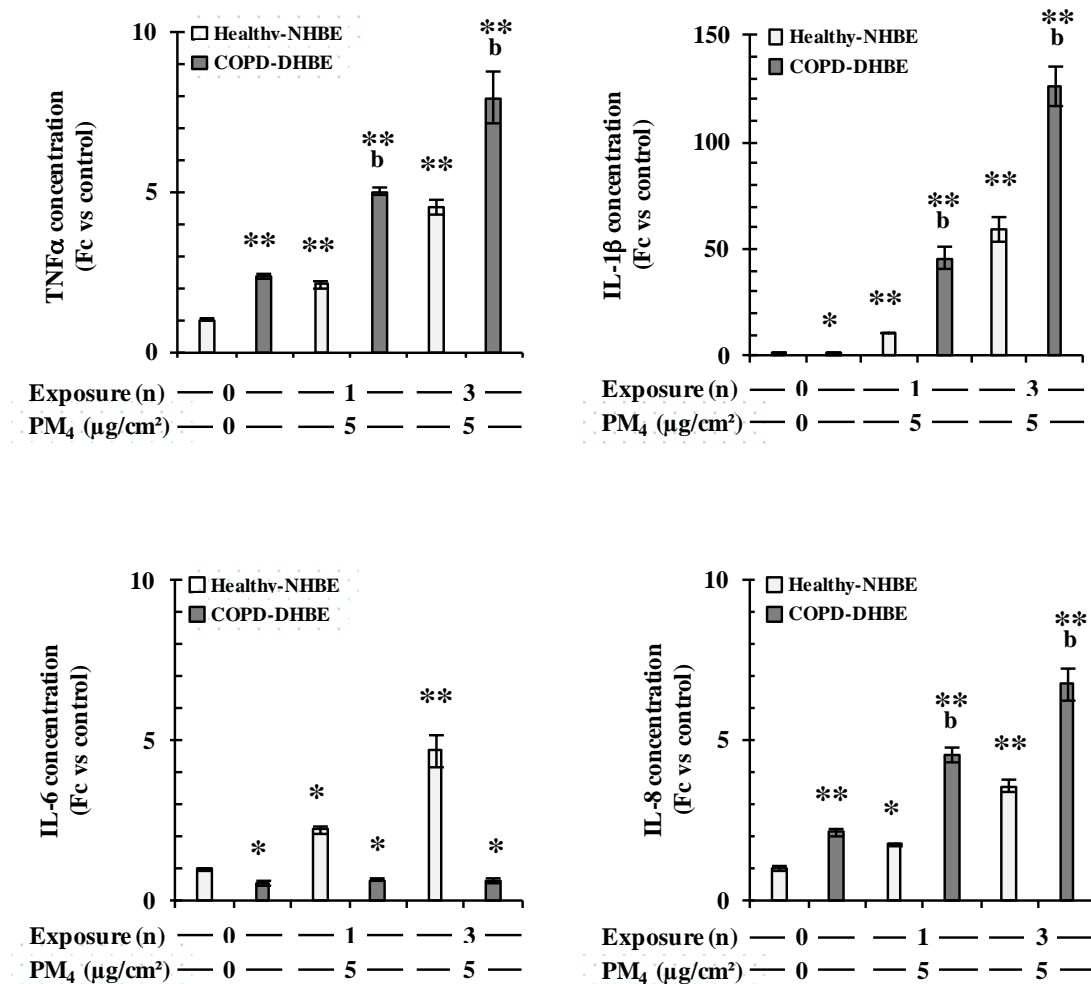
Figure 3 shows the oxidative endpoints studied in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived  $\text{PM}_{10}$ . Significant differences between non-exposed NHBE and COPD-DHBE cells were reported for protein-CO concentration, TAS, and glutathione status ( $p < 0.05$ ), whereas no significant difference was observed for MDA concentration, 8-OHdG concentration and SOD activity. MDA production was only increased after three exposures to  $\text{PM}_{10}$  in NHBE (i.e., 4.8-fold change vs NHBE controls) and particularly in COPD-DHBE cells (i.e., 7.28-fold change vs COPD-DHBE controls;  $p < 0.01$ ). There were exposure-dependent changes of protein-CO and 8-OHdG concentration in NHBE (i.e., respectively 2.40 and 4.60-fold change after three exposures, vs NHBE controls) and particularly COPD-DHBE cells (i.e., respectively, 2.71 and 7.31-fold change after three exposure, vs COPD-DHBE controls,  $p < 0.01$ ). Exposure-dependent TAS decreases and glutathione oxidation increases were reported in NHBE (i.e., respectively 0.46 and 1.84-fold change after three exposures, vs NHBE controls) and particularly in COPD-DHBE cells (i.e., respectively, 0.30 and 10.36-fold change after three exposure, vs COPD-DHBE controls,  $p < 0.01$ ). Interestingly, SOD activity increased after one exposure (i.e., NHBE: 1.55-fold change vs NHBE controls, and COPD-DHBE: 1.78-fold change vs COPD-DHBE controls), but slightly decreased (i.e., NHBE: 1.37-fold change vs NHBE controls, and COPD-DHBE: 1.04-fold change vs COPD-DHBE controls) after three exposures to  $\text{PM}_{10}$  in both HBE cells types ( $p < 0.05$ ). All these results showed that NHBE and particularly COPD-DHBE repeated exposure to air-pollution-derived  $\text{PM}_{10}$  induced an important oxidative stress with high oxidative damages on macromolecules, with more considerable effects in COPD-DHBE cells.

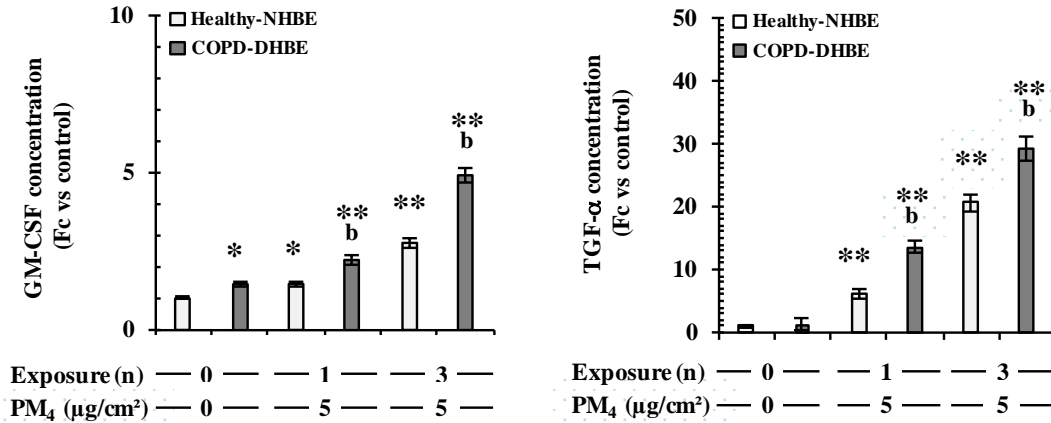


**Figure 3:** Malondialdehyde (MDA), carbonylated protein (protein-CO), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), total antioxidant status (TAS), superoxide dismutase (SOD), and glutathione status (i.e. glutathione disulfide/reduced glutathione, GSSG/GSH) were evaluated in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three exposures for 4h at 24h intervals to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> at 5μg/cm<sup>2</sup>. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=6). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*; *p*<0.05; \*\*: *p*<0.01; versus COPD-DHBE controls: <sup>b</sup>; *p*<0.01).

### Cytokine secretion-induced by PM<sub>4</sub> exposure in NHBE and COPD-DHBE cells

The inflammatory status in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub> was evaluated by studying cytokine secretion as shown in Figure 4. For the different cytokines, the quantities of the constitutive release by NHBE and COPD-DHBE cells, as expressed in pg/mg of protein, were the following: TNF- $\alpha$ : 50.8  $\pm$  5.3 vs 120.4  $\pm$  7.6, IL-1 $\beta$ : 2.4 $\pm$ 0.3 vs 3.7 $\pm$ 0.5, IL-6: 457 $\pm$ 29 vs 258 $\pm$ 26, IL-8: 2,173 $\pm$ 220 vs 4,629 $\pm$ 208, GM-CSF: 321 $\pm$ 11 vs 461 $\pm$ 20, and TGF- $\alpha$ : 12.3 $\pm$ 1.5 vs 16.0 $\pm$ 7.73. Constitutive concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and GM-CSF were higher in COPD-DHBE controls as compared to NHBE controls ( $p < 0.05$ ). In contrast, constitutive concentrations of IL-6 were lower in control COPD-DHBE cells as compared to NHBE controls ( $p < 0.05$ ). Moreover, the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\alpha$ , and GM-CSF by NHBE and COPD-DHBE cells after their repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> showed not only a dependence upon the number of exposure, but also a greater sensitivity of COPD-DHBE cells vs NHBE cells ( $p < 0.01$ ). Indeed, fold-changes in three times-exposed NHBE and COPD-DHBE cells, relatively to their respective controls, were as follows: TNF- $\alpha$ : 4.33 vs 4.55, IL-1 $\beta$ : 59.3 vs 90.1, IL-8: 3.58 vs 3.98, GM-CSF: 2.74 vs 3.42, and TGF- $\alpha$ : 20.06 vs 24.57. However, while increases of IL-6 secretion were reported in NHBE cells after one or three exposures to air pollution-derived PM<sub>4</sub>, no significant change was reported in exposed COPD-DHBE cells. Hence, these results closely supported that PM<sub>4</sub> is responsible for the induction of some inflammatory mediators in repeatedly-exposed NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells.





**Figure 4:** Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), granulocyte macrophage- colony stimulating factor (GM-CSF) and transforming growth factor-alpha (TGF- $\beta$ ), were quantified in the culture media of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three exposures for 4h at 24h intervals to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> at 5 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=6). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*: *p*<0.05; \*\*: *p*<0.01; versus COPD-DHBE controls: <sup>b</sup>: *p*<0.01).

#### Gene expression of EMX-induced by PM<sub>4</sub> exposure in NHBE and COPD-DHBE cells

Table 1 shows the relative XME gene expression in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. Gene expression profile was evaluated in COPD-DHBE controls compared to NHBE controls and indicated that 22 genes were up-regulated (i.e., Fc value>2, *p*<0.05) and 2 genes were down-regulated (i.e., Fc<0.5, *p*<0.05). These genes code for nuclear factors (i.e., ARNT2, HIF3A), phase I XMEs (e.g., AADAC, ADH5, ALDH1A2, ALDH3A2, ALDH3B2, CES3, CYP2A6, CYP2B6, CYP2S1, CYP39A1, CYP7B1, DPYD, MAOA, NQO1, SUOX), phase II XMEs (e.g., SULT1A1, SULT1A2, UGT1A5), and transporters (i.e., ABCG2, ATP7A, SLC15A1, SLC7A6, SLCO4A1). A Venn diagram has been performed with the aim of directly observing the gene expression pattern changes among NHBE and COPD-DHBE cells exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub> (Figure 5). A gene expression differential between control and PM<sub>4</sub>-exposed NHBE cells was reported. Indeed, 36 and 29 genes were respectively up and down-regulated in NHBE cells 24h after one exposure to particles, whereas only 4 and 24 genes were respectively up and down regulated in these cells after three exposures. Some genes were simultaneously deregulated in NHBE cells whatever the number of exposure to PM<sub>4</sub>: 8 genes encoding phase I XMEs (e.g., ALDH3A2, CYP1A1, NNMT), a phase II XME (e.g., GSTA2), and transporters (i.e., ABCB1, ABCC11, ABCC3, SLC1A2) were modified. In COPD-DHBE cells, one exposure to particles induced the down-regulation of 31 genes, while three exposure to particles caused the up and down-regulation of 1 and 6 genes, respectively. Common changes of the mRNA levels within COPD-DHBE cells after one and three exposures to air pollution-derived PM<sub>4</sub> affected only 3 genes encoding a phase I XMEs (e.g., CYP26A1, DPYD) and a transporter (i.e., SLC1A3). Moreover, 12 of the genes reported as deregulated in NHBE cells 24h after their exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> were also deregulated in COPD-DHBE controls. Among them, there were genes encoding for nuclear factors (i.e., ARNT2, HIF3A), phase I XMEs (e.g., AADAC, ADH5, ALDH1A2, ALDH3A2, ALDH3B2, CES3, CYP39A1), phase II XMEs (e.g., SULT1A2, UGT1A5), and transporters (i.e., ABCG2, SLC7A6, SLCO4A1).

Table 1: Gene expression of xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in healthy or BPCO-NHBE exposed to PM<sub>4</sub>

Gene symbol	COPD-NHBE control vs healthy-NHBE control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs		
	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	p-Result	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	Result
	value	p-value		value	p-value		value	value		value	p-value		value	p-value	
AADAC	0.206	0.021	Down	0.213	0.004	Down									
ABCA1										0.342	0.033	Down			
ABCA4										0.357	0.042	Down			
ABCA7										0.287	0.046	Down			
ABCB1				0.128	0.009	Down	10.568	0.014	Up						
ABCC11				0.166	0.004	Down	0.828	0.023	Up						
ABCC3				2.023	0.016	Up	1.369	0.118	Up						
ABCC4							1.593	0.119	Up						
ABCC9				0.078	0.002	Down									
ABCG2	4.122	0.001	Up	2.547	0	Up									
ADH1C				3.709	0.007	Up									
ADH5	2.016	0.004	Up	2.531	0.011	Up									
ADHFE1				2.435	0.004	Up									
AHR										0.291	0.046	Down			
AKR1B10				2.648	0.004	Up									
ALDH18A1							1.031	0.773	Up	0.406	0.042	Down			
ALDH1A2	6.396	0.023	Up	2.809	0.025	Up									
ALDH1A3							2.211	0.016	Up						
ALDH1B1										0.414	0.046	Down			
ALDH1L1				3.041	0.013	Up									
ALDH3A1				15.044	0.006	Up									
ALDH3A2	2.324	0.024	Up	2.4	0.005	Up	2.313	0.074	Up						
ALDH3B2	2.155	0.043	Up	0.211	0.007	Down				0.052	0.004	Down			
ALDH7A1										0.435	0.001	Down			
ALDH8A1				0.231	0.03	Down									
ALDH9A1							1.482	0.073	Up						
AOC3							1.922	0.012	Up						
ARNT2	0.45	0.013	Down	0.277	0.039	Down									
AS3MT										0.414	0.022	Down			
ATP6V0C				0.357	0.008	Down									

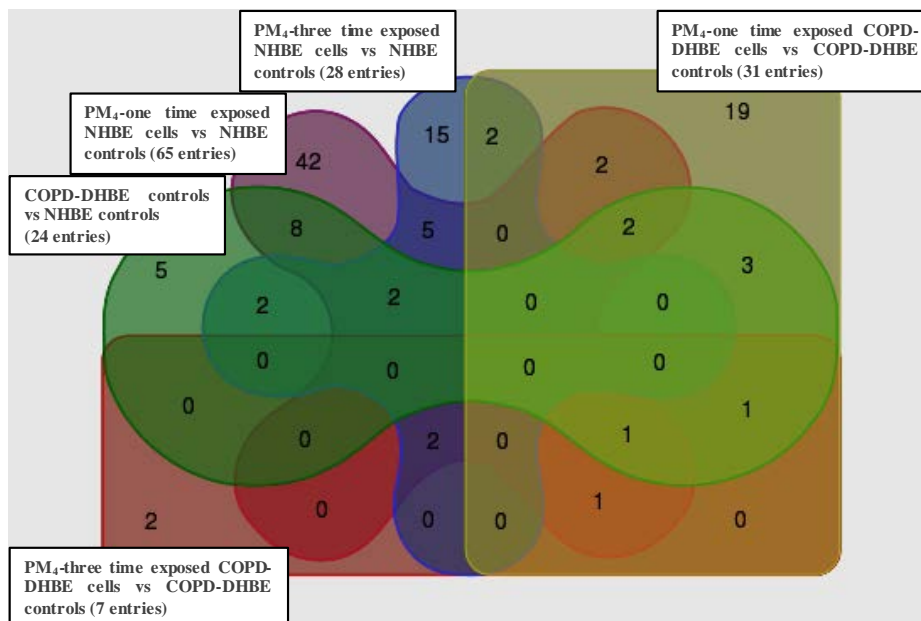
Gene symbol	COPD-NHBE control vs healthy-NHBE control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs		
	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	p-Result	Fc	Corrected	Result	Fc	Corrected	Result
	value	p-value		value	p-value		value	value		value	p-value		value	p-value	
ATP7A	2.284	0.032	Up												
ATP7B										0.346	0.036	Down			
BAAT							2.156	0.046	Down	0.247	0.032	Down			
BLMH							1.335	0.118	Down						
CES1				34.778	0	Up									
CES3	5.08	0.009	Up	5.27	0.002	Up									
CYP1A1				58.787	0	Up	84.989	0	Up				27.093	0.046	Up
CYP1A2													0.066	0.019	Down
CYP1B1				2.29	0.004	Up									
CYP26A1				3.311	0.024	Up				0.222	0.007	Down	0.339	0.046	Down
CYP27A1							1.398	0.116	Up						
CYP27C1							1.903	0.008	Up						
CYP2A6	3.776	0.019	Up												
CYP2A7															
CYP2B6	5.402	0.032	Up												
CYP2C19				0.317	0.049	Down									
CYP2E1				0.213	0.009	Down									
CYP2S1	2.229	0.048	Up												
CYP39A1	2.845	0.033	Up	3.895	0.004	Up				0.213	0.027	Down			
CYP46A1				0.157	0.036	Down									
CYP4B1				3.027	0.007	Up									
CYP4F11				3.493	0.007	Up									
CYP4F12				11.45	0.007	Up									
CYP7B1	2.186	0.007	Up												
CYP8B1				0.321	0.01	Down									
DHRS4				2.099	0.004	Up									
DPYD	2.491	0.047	Up							0.175	0.032	Down	0.225	0.032	Down
EP300							1.907	0.016	Down						
ESD							1.226	0.005	Up						
ESR2				0.284	0.036	Down									



Table 1 (continued): Gene expression of xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in healthy or BPCO-NHBE exposed to PM<sub>4</sub>

Gene symbol	COPD-NHBE control vs healthy-NHBE control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs		
	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result
FMO2				0.317	0.01	Down									
FMO5										0.187	0.046	Down			
GSTA2				5.462	0.004	Up	3.899	0.235	Up						
GSTA5				4.737	0.022	Up									
GSTK1													0.469	0.039	Down
GSTM2				0.497	0.007	Down									
GSTM3				0.449	0.007	Down									
GZMB										0.42	0.027	Down			
HIF1A				0.327	0.01	Down									
HIF3A	4.348	0.022	Up												
HNMT							1.366	0.016	Up						
HSD17B10				2.532	0.003	Up									
MAOA	2.065	0.001	Up				1.303	0.038	Up						
MT1A							2.148	0	Down						
MT1M							0.646	0.435	Up						
NFE2L2										0.416	0.046	Down			
NNMT				0.12	0.016	Down	0.226	0.276	Up				0.113	0.047	Down
NQO1				2.788	0.014	Up									
PON3				0.076	0.004	Down									
RBP1				0.409	0.012	Down									
SLC15A1	2.143	0.017	Up												
SLC16A1							1.486	0.019	Up						
SLC19A1							1.885	0.037	Up						
SLC1A2				0.195	0.006	Down	1.132	0.032	Up						
SLC1A3				0.458	0.046	Down				0.307	0.046	Down	0.248	0.032	Down
SLC22A3				0.372	0.007	Down									
SLC29A2				2.012	0.019	Up									
SLC29A3										0.467	0.036	Down			
SLC2A1										0.335	0.039	Down			
SLC38A1										0.4	0.036	Down			

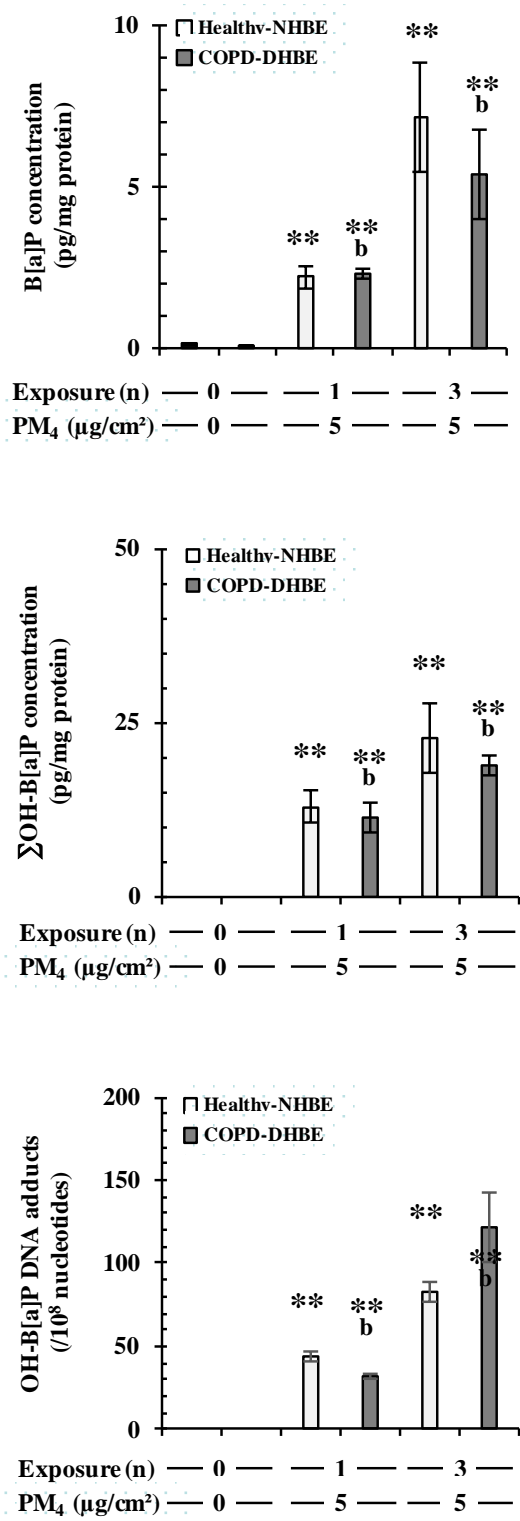
Gene symbol	COPD-NHBE control vs healthy-NHBE control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			Healthy NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -one time exposed vs control			COPD NHBE: PM <sub>4</sub> -three times exposed vs		
	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result	Fc value	Corrected p-value	Result
SLC3A2				2.435	0.003	Up									
SLC47A2				6.917	0.025	Up									
SLC7A11				3.018	0.002	Up									
SLC7A5							1.786	0.012	Up						
SLC7A6	2.08	0.035	Up	2.446	0.002	Up									
SLCO1B3				2.292	0.007	Up				0.03	0.033	Down			
SLCO2A1				0.342	0.004	Down									
SLCO2B1							208.538	0.014	Up						
SLCO3A1							1.076	0.152	Up						
SLCO4A1	2.155	0.045	Up	4.815	0.011	Up									
SPR										0.464	0.015	Down			
SULT1A1	69.726	0.038	Up							0.433	0.001	Down			
SULT1A2	4.652	0.001	Up	5.165	0.023	Up									
SULT1B1				4.616	0.015	Up									
SULT1E1				2.447	0.022	Up									
SULT4A1				3.436	0.004	Up									
SUOX	2.474	0.021	Up							0.403	0.022	Down			
THRA										0.436	0.032	Down			
TXN				2.198	0.036	Up									
UGT1A10				0.373	0.02	Down									
UGT1A5	2.826	0.023	Up							0.137	0.019	Down			
UGT1A6										0.215	0.046	Down			
UGT1A8				0.14	0.01	Down									
UGT1A9				0.108	0.048	Down									
UGT2B15										0.06	0.046	Down			
UGT2B17										0.022	0.028	Down			
UGT2B7				0.082	0.039	Down									
VDAC2				0.474	0.002	Down				0.393	0.036	Down			



**Figure 5:** Venn diagram representing the changes of gene expression patterns of xenobiotic-metabolizing enzymes normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three exposures for 4h at 24h intervals to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> at 5µg/cm<sup>2</sup> (n=3; versus NHBE or COPD-DHBE controls; Fold change>2 or <0.5, p<0.05).

**B[a]P, B[a]P metabolites, and OH-B[a]P DNA adducts produced by PM<sub>4</sub> exposure in NHBE and COPD-DHBE cells**

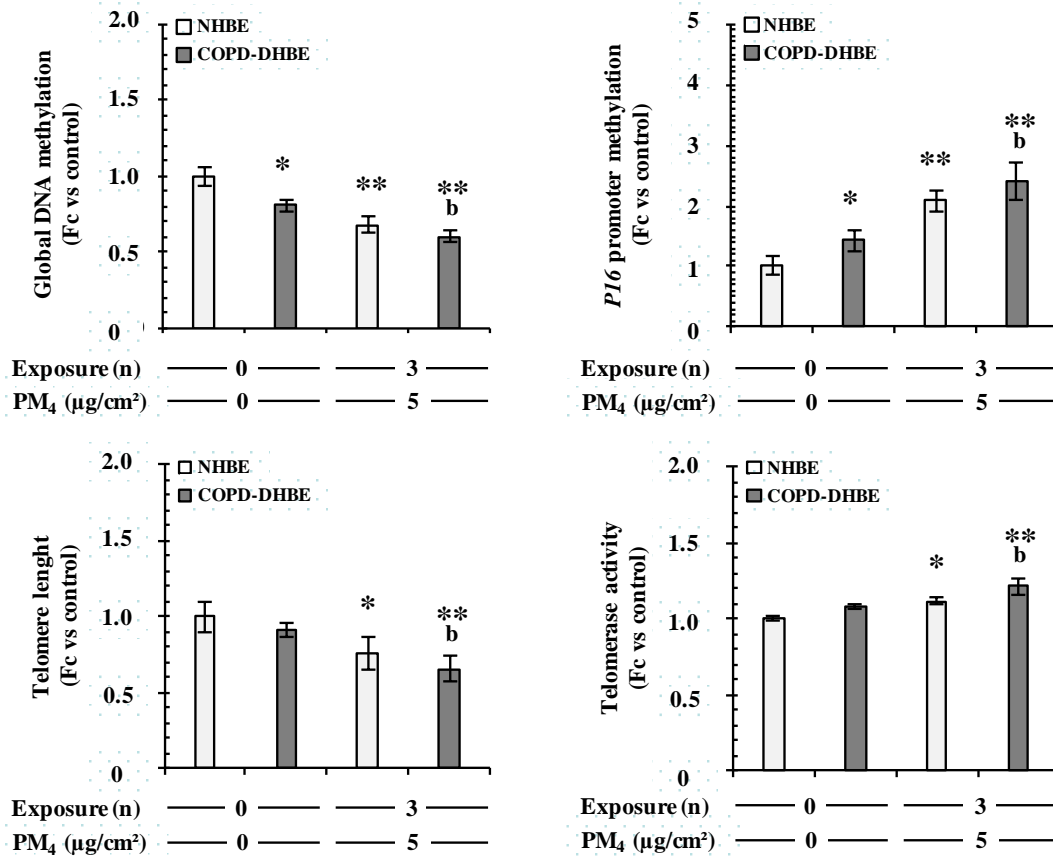
Figure 6 indicates the concentration of B[a]P, OH-B[a]P metabolites, and OH-B[a]P DNA adducts in NHBE and COPD-DHBE cells 24h after their exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. The concentration of B[a]P and its OH-metabolites went up according to an exposure-dependent manner in NHBE cells, and to a lesser extent in COPD-DHBE cells (p<0.01). Indeed, the concentrations of B[a]P and its OH-metabolites after three exposure to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> were respectively the following: NHBE: 7.12±1.38 and 22.73±3.07 pg/mg of protein, and COPD-DHBE: 5.35±0.8 and 18.87±1.48 pg/mg of protein. Moreover, the formation of OH-B[a]P DNA adducts was observed in NHBE and particularly in COPD-DHBE cells (i.e., respectively, 83.1±6.1 vs 121.6±20.4 OH-B[a]P DNA adducts/10<sup>8</sup> nucleotides). The B[a]P-coated onto air pollution-derived PM<sub>4</sub> was also metabolized and, thereafter, its highly biologically reactive metabolites interacted with DNA to form DNA adducts, which can favor the genetic instability.

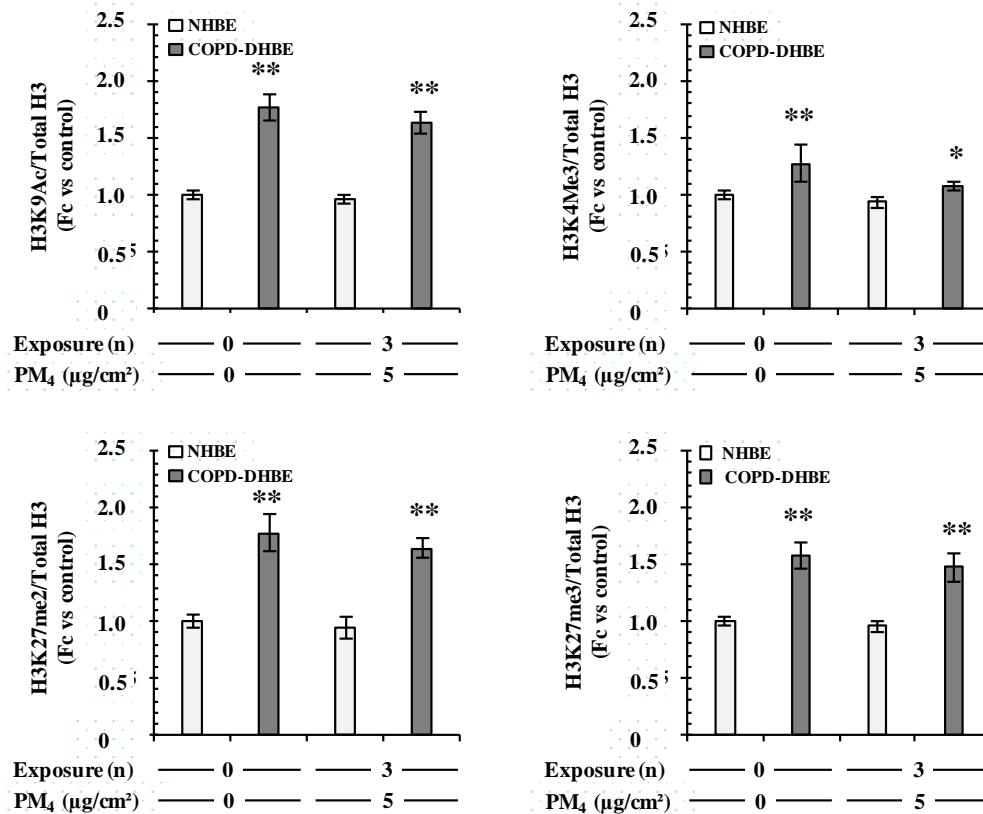


**Figure 6:** Benzo[a]pyrene (B[a]P), B[a]P metabolites, and OH-B[a]P DNA adducts were measured in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three exposures for 4h at 24h intervals to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> at 5μg/cm<sup>2</sup>. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=3). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*\*: *p*<0.01; versus COPD-DHBE controls: <sup>b</sup>: *p*<0.01).

### Epigenetic alterations-induced by PM<sub>4</sub> exposure in NHBE and COPD-DHBE cells

As shown in Figure 7, a global DNA hypomethylation and a *P16* gene promoter hypermethylation were measured in COPD-DHBE controls, as compared to NHBE controls. Moreover, repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> induced significant changes in DNA and *P16* gene promoter methylation in NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells ( $p < 0.05$ ). Indeed, fold-changes relatively to their respective controls in three times-exposed NHBE and COPD-DHBE cells were as follows: global DNA methylation: 0.67 vs 0.74, and *P16* gene promoter methylation: 2.07 vs 2.40. A significant shortening of telomere length and increase of telomerase activity were reported in NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells after their repeated exposure to PM<sub>4</sub>. Indeed, fold-changes relatively to their respective controls in three times-exposed NHBE and COPD-DHBE cells were the following: telomere length: 0.75 vs 0.70, and telomerase activity: 1.10 vs 1.21. Significant differences in H3K9 acetylation, H3K4 methylation, and H3K27 di- and trimethylation were reported in COPD-DHBE controls vs NHBE controls ( $p < 0.05$ ). Nevertheless, repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> did not affect the above described histone H3 modifications in NHBE cells neither in COPD-DHBE cells. Consequently, the DNA global hypomethylation, *P16* gene promoter hypermethylation, telomere length shortening, and increased telomerase activity we reported can favor genetic instability, active cell proliferation or persistent replication status in NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>.





**Figure 7:** Global DNA methylation, *P16* promoter methylation, telomere length, telomerase activity, and histone H3 modifications were evaluated normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after three repeated exposures for 4h at 24h intervals to air-pollution-derived PM<sub>4</sub> at 5μg/cm<sup>2</sup>. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=6). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*: *p*<0.05; \*\*: *p*<0.01; versus COPD-DHBE controls: <sup>b</sup>: *p*<0.01).

## DISCUSSION

Despite the intensive research effort, researchers are still far from having a complete detailed mechanistic explanation of the causal relation between PM and health effects (Longhin et al., 2016). Toxicological studies on *in vitro* models are also crucial. However, while air pollution is now a known risk factor for asthma and COPD overlap syndrome, there is now an urgent need to consider more relevant *in vitro* models, taking into account certain susceptible diseased phenotypes (Ito et al., 2016). In order to be closer to realistic exposure conditions, we also used NHBE and sensible COPD-DHBE cell models to better evaluate whether these cell models are sustained or whether they exhibit an adaptive response in terms of cytotoxic, oxidative, inflammatory, metabolism, and epigenetic endpoints, after the repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub>.

The cell culture conditions we used in this work allowed us to ensure that NHBE and COPD-DHBE cells exhibit a differentiation phenotype with many similarity points with the *in vivo* human bronchial epithelium (Bérubé et al., 2010; Boublil et al., 2013; Pezzulo et al., 2011). Pan-cytokeratin protein expression, which is characteristic of all epithelia types, and MUC5AC protein secretion, which is one of the major lung mucus component, were detected using immunofluorescence labelling in both the healthy and diseased cell models. According to Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp (2015), these results confirmed that the cell-types of NHBE and COPD-DHBE cells were relatively closed to the *in vivo* conditions found in the human bronchial epithelia. To date, only few studies used HBE cells to evaluate air pollution-derived PM toxicity and among them, even less differentiate healthy or diseased HBE cells at ALI conditions (Boublil et al., 2013). NHBE and DHBE cell differentiation at ALI reconstitutes pseudostratified epithelia and in these conditions these cells have gene expression profile similarities with the pulmonary cells directly taken from the patient (Pezzulo et al., 2011). Recent research studies focused on new cell culture development with the objective of getting closer to human

conditions. For instance, the new 3D organo-typic mucociliary-phenotype models, derived from NHBE or DHBE tissues and grown at ALI could be extremely relevant to further PM toxicity studies (Bérubé et al., 2010).

The SRM2786 we used, also called fine particulate matter (i.e., PM<sub>4</sub>) and provided by the NIST, was an atmospheric particulate material collected at a major exhibition center in Prague, Czech Republic. While the sample is not intended to be representative of the area from which it was collected, it should generally typify air pollution-derived PM from an urban surrounding. In this work, air pollution derived-PM<sub>4</sub> exposure induced dose- and time-dependent ATP concentration decreases and G6PD releases both in NHBE and COPD-DHBE cells. Based on these results, in this work, the non-cytotoxic dose of 5 μg/cm<sup>2</sup> was chosen to the further study of the other toxicological endpoints. The PM dose we applied is also among the lowest reported in literature to give significantly harmful effects (Longhin et al., 2013). It was of great importance to reduce PM exposure as much as possible to keep a sufficient dose to study underlying mechanisms while contributing to the effort to be as close as possible to human exposure levels.

Oxidative stress is often considered to be a primary toxicity effect of air pollution-derived PM (Sawyer et al., 2010). In addition to the well-known role of metals in ROS generation, the implication of organic compounds was recently confirmed by Longhin et al., (2013), who reported that PM with higher PAH quantities induced a higher oxidative stress. In this work, exposure-dependent increases in lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA adduct formation, on the one hand, and alterations of TAS, SOD activity, and glutathione status, on the other hand, were reported in NHBE cells and more importantly in COPD-DHBE cells. Accordingly, the PM<sub>4</sub> we used contained inorganic elements usually associated with the natural environment (e.g., Ca, Mg, Na, Ti), or anthropogenic elements (e.g., Al, As, Cu, Cr, Fe, Mn, Zn). Among them ( $\Sigma$ =203.3mg/g), Al (33.84mg/g), Cr (0.462mg/g), Cu (0.847mg/g), Fe (48.90mg/g), Mn (0.780mg/g), and Zn (1.793mg/g), generally associated with redox reactions, were the most abundantly present. Moreover, the prooxidant effects we reported could also be related to the organic species found within the PM<sub>4</sub>, and notably PAHs (i.e.,  $\Sigma$ =74.47 μg/g), nitro-PAHs (i.e., NPAHs,  $\Sigma$ =154.9ng/g), and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans (i.e. PCDDs/Fs,  $\Sigma$ PCDDs/Fs=13.29ng/g) (Ghio et al., 2012). The occurrence of oxidative stress conditions induced high oxidative damages on macromolecules such as DNA (i.e., 8-OHdG), proteins (i.e., protein-CO) or lipids (i.e., MDA production), which can dramatically deregulated cell homeostasis through the gene expression modulation or DNA mutation, protein alteration with a loss of function, and lipid membrane oxidative degradation with loss of integrity and fluidity (Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Gualtieri et al., 2010, 2011) All the oxidative injuries caused by the repeated exposure to PM<sub>4</sub> were more pronounced in COPD NHBE cells vs NHBE cells, thereby confirming their higher sensitivity to external injuries. Accordingly, Caramori et al. (2011) showed that COPD states is associated with a rising oxidative stress, rendering them more sensible to the other harmful effects of inhaled toxicants.

In the last decades, intensive research onto the underlying mechanisms of inflammation has described the outlines of the intricate relationship between oxidative stress and inflammation (Lonkar and Dedon, 2010). Clearance of pathogens from the body is the principle objective of inflammation for which ROS produced by cells play a fundamental role. In contrast, if ROS are not controlled by setting up an array of sophisticated antioxidant mechanisms, it leads to inflammatory cell and/or tissue injury. Barnes et al. (2009) indicated that multiple cytokines play a role in inflammation orchestration in inflammatory airway diseases, such as COPD. Accordingly, we found higher constitutive levels of TNF-α, IL-1β, IL-8, and GM-CSF in COPD-DHBE controls than in NHBE controls, indicating that the COPD cell model still conserved its sensible inflammatory status. Proinflammatory cytokines, like TNF-α and IL-1β, are also generally increased in COPD, and participate to inflammation amplification and maintenance, partially through the activation of the transcription factor (NF)-κB. Several other cytokines, as TGF-α and GM-CSF, are implicated in COPD diseases by promoting inflammatory cells differentiation and survival or by favoring structural cell proliferation and/or activation, contributing thereby to the airway remodeling. Additionally, other chemokines play a key role in the inflammatory cell recruitment from the circulation; the first chemokine identified in COPD was IL-8. While IL-6 is generally described as increased in sputum, exhaled breath, and plasma of COPD patients, particularly during exacerbation, this cytokine was found at relatively low levels in the COPD-DHBE cell model we developed. IL-6, which often works in concert with other cytokines, provides a link between innate and acquired immunity. In this work, there was an increased secretion of some members of this cytokine network in NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. The proinflammatory response produced by PM<sub>4</sub> exposure was in agreement with previous results underlining the proinflammatory properties of different types of air pollution-derived PM (Boublil et al., 2013; Dergham et al., 2012, 2015; Longhin et al., 2016; Soukup et al., 2015; Zhou et al., 2015). Accordingly, Lodovici and Bigagli (2011) reported a correlation between redox-active compounds (e.g., metals, PAHs) of PM and proinflammatory events in NHBE cells, which might rely on the regulation of redox sensitive transcription factors, such as NF-κB. The sustainable oxidative and inflammatory responses of NHBE cells and particularly COPD-DHBE cells repeatedly exposed to PM<sub>4</sub> were also consistent, and supported the higher sensitivity of the diseased cell model.

Air pollution-derived PM contains a wide variety of organic chemicals including PAHs, NPAHs, and PCDDs/Fs, which could, directly or indirectly, through their metabolic activation, participate to the induction of oxidative and proinflammatory events in human bronchial lung cell models (Boublil et al., 2013; Dergham et al., 2012, 2015; Longhin et al., 2013, 2016; Zhou et al., 2015). Different XME gene expression profiles were reported in NHBE and COPD-DHBE cells, both in control and notably in repeatedly exposed cells. The affected XME genes we measured encoded nuclear factors, phase I and phase II XMEs, and transporters closely implied in the metabolic activation of the organic chemicals-coated onto PM<sub>4</sub>. The number of genes reported as induced in NHBE cells was higher than in COPD-DHBE cells, thereby suggesting their greater metabolic capacities. The metabolic activation of most of the organic chemicals within PM usually requires the intervention of phase I XMEs; among them, CYP1 family enzymes are involved in the conversion of PAHs, NPAHs, PCDD/Fs procarcinogens, directly under AhR regulation. Indeed, CYP1A1 and 1B1 isoforms that are constitutively poorly or not expressed in bronchial tissues exhibited higher expression levels in NHBE cells than in COPD-DHBE cells after their repeated exposure to PM<sub>4</sub>. Likewise, mRNA transcripts of some genes encoding phase II XMEs (e.g., GSTA2, GSTA5, SULT1A2, SULT1B1, SULT1E1, SULT4A1) were detected at higher levels in NHBE cells than in COPD-DHBE cells. The apparent difference between the gene expressions of XMEs in both the HBE cell-types could be partially explained by the intriguing interplay between AhR and NF-κB (Tian et al., 2002). AhR plays a pivotal role in mediating xenobiotic detoxification and toxicological responses induced by PAHs and other related compounds, whereas NF-κB is a redox sensitive transcription factor, which regulates the inflammatory response. Due to AhR and NF-κB reciprocal interactions, stimuli that activate NF-κB may have an impact on the AhR-mediated signal transduction pathways (Vondráček et al., 2011). Hence, the higher oxidative and inflammatory status found in COPD-DHBE cells can contribute to explain their lower capacity to metabolize organic chemicals. Such disparities were reported in the gene expression of several membrane transporters (e.g. ABCB1, ABCC11, ABCC3, ABCC9, ABCG2, SLC1A2, SLC1A3, SLC22A3, SLC29A2, SLC3A2, SLC47A2, SLC7A11, SLC7A6, SLCO1B3, SLCO2A1, SLCO4A1), which are involved in the efflux of chemicals. Taken together, these results supported the real need to use sensible diseased models, such as COPD-DHBE cells, to better consider the sensitive individuals in terms of metabolic activation of inhaled toxicants, and, therefore, in this work, to better evaluate the harmful effects of air pollution-derived PM<sub>4</sub>.

In strong agreement with the above statements, there were exposure-dependent increases of OH-B[a]P metabolites in NHBE cells, and to a lesser extent in COPD-DHBE cells. Accordingly, the SRM2786 we used contained a non-negligible concentrations of B[a]P (i.e., 3.7±0.13µg/g), which could partially contribute to the exposure-dependent gene expression of the phase I and II XMEs closely involved in their metabolic activation (e.g., CYP and GST isoforms). Accordingly, Boublil et al., (2013) have already provided evidence of PAH bioavailability and metabolic activation in PM-exposed NHBE cells. However, in repeatedly exposed COPD-DHBE cells, despite the lower gene expression of PAH-related XMEs, there was a more pronounced OH-B[a]P DNA adduct formation. This apparent discrepancy could be partially explained by the COPD etiology, which is generally associated with a long-term smoking and a subsequent exposure of the respiratory tract to inhaled toxicants making it very complicated to repair all the DNA damages (Pauk et al., 2013). Although COPD-DHBE cells seemed to have only moderate capacity to convert PAHs into highly biologically reactive metabolites, such as OH-B[a]P, they appeared to be more sensible to the formation and/or the sustainability of OH-B[a]P adducts, probably because their diseased state could affect their defense capacities (Rode et al., 2016). Taken together, these results supported the real need to use susceptible models, such as COPD-DHBE cells, to better consider the sensitivity of compromised individuals in terms of metabolic activation, and, therefore, in this work, to better evaluate the harmful effects of air pollution-derived PM<sub>4</sub>.

Because of their potential heritable and their reversible nature, epigenetic modifications provide a plausible link between the environment and the gene expression alteration that might lead to disease (Ji and Khurana Hershey, 2012). In this work, there were a global DNA hypomethylation but a *P16* gene promoter hypermethylation in COPD-DHBE controls vs NHBE controls. In NHBE cells and particularly in COPD-DHBE cells, repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>4</sub> was associated with a global DNA methylation and a *P16* gene promoter hypermethylation. Accordingly, Clifford et al. (2016) reported that exposure to diesel exhaust led to differential methylation of CpG sites from genes involved in transcription factor activity, protein metabolism, cell adhesion, and vascular development, among others. Moreover, acute exposure to air pollution-derived PM resulted in *P16* gene promoter hypermethylation, which can lead to genomic instability and cell cycle progress (Baccarelli et al., 2009; Soberanes et al., 2012; Tarantini et al., 2009). A significant shortening of the telomere length and increase of the telomerase activity were reported not only in NHBE cells but also in COPD-DHBE cells after their repeated exposure to PM<sub>4</sub>. Both these epigenetic events can reinforce the genomic instability and, therefore, encourage the cell active replication. Indeed, short telomere length is often associated with a decreased lung function and an increasing risk of developing COPD pathology (Rodes et al., 2016). Other studies indicated that oxidative stress and chronic inflammation, which can also be mediated by exposure to combustion products such as PAHs, are considered to be some major mechanisms that influence telomere length (Zhang et al., 2013). The telomerase activity, raised in COPD patients, can be due to the oxidant/antioxidant imbalance, which, as we

previously described, is generally found in these patients (Bozkus et al., 2016). With regards to histone H3 modifications, differences in H3K9 acetylation, H3K4 methylation, and H3K27 di- and trimethylation were reported in COPD-DHBE controls vs NHBE controls. In agreement with these results, Vucic et al., (2014) showed that extracellular, degradation-resistant, hyperacetylated histone H3 was elevated in COPD patients. They indicated that histone methylation, notably at H3K4 and H3K27, is an important mechanism involved in COPD biology. Indeed, H3K4 methylation is rather linked to gene activation, whereas H3K27 methylation is generally associated with gene repression. However, the repeated exposure of both the HBE cell-types to PM<sub>4</sub> did not affect the above-cited histone H3 modifications. Although several studies have shown that the epigenetic events, such as histone acetylation/deacetylation or methylation/demethylation, contributed to air pollutant induced lung inflammatory response using *in vitro* and *in vivo* models, the exact role of histone modifications in chromatin remodeling of chronic lung diseases remains unclear (Sundar et al., 2013). Hence, these results supported the emergence of epigenetic alterations in NHBE cells and notably in COPD-DHBE cells repeatedly exposed to PM<sub>4</sub>, and supported the higher sensitivity of the diseased cell model, thereby underlining the real need to use sensible diseased models to better consider the sensitive individuals in terms of epigenetic regulation of some of the underlying mechanisms involved in the health effects induced by air pollution-derived PM.

To conclude, in this work, with the aim of being closer to environmental human exposure levels, we have developed a relevant experimental strategy allowing us to repeatedly exposed NHBE and COPD-DHBE cells to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>4</sub>. By studying cytotoxic, oxidative, inflammatory, metabolism, and epigenetic endpoints in repeatedly healthy and diseased cell models, we highlighted not only the key role played by all these mechanisms but also the difference in their responsiveness to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. Indeed, COPD-DHBE cells were more sensitive to pollution-derived PM<sub>4</sub> and showed an exacerbation of some of the underlying mechanisms normally induced. The use of innovative *in vitro* exposure systems such as NHBE and COPD-DHBE cells could therefore be considered as a very useful and powerful promising tool in the field of the respiratory toxicology. However, further studies based on healthy or diseased HBE cell models will be needed to better evaluate the consequences of longer-term effects produced by air pollution-derived PM.

## FUNDING SOURCES

This work benefited from grants from the ITMO Cancer (i.e., Plan Cancer 2009-2013, Contract n°ENV201210), the University of Lille, and the Mines de Douai. BL's PhD is supported by the Région Nord-Pas de Calais and the Mines de Douai (Contract n°13005131).

## CONFLICT OF INTEREST

All authors of this manuscript do not have any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

## REFERENCES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2009 Air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an *in vitro* coculture lung model *Toxicol In vitro* 2, 37-46.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2010. Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after *in vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub> *Chem Biol Interact* 188, 558-565.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., André, V., Gosset, P., Billet, S., Le Goff, J., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., Shirali, P., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model *J Appl Toxicol* 33, 109-119.
- Abbas, I., Verdin, A., Escande, F., Saint-Georges, F., Cazier, F., Mulliez, P., Courcot, D., Shirali, P., Gosset, P., Garçon, G., 2016. *In vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5-0.3</sub> induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Env Res* 147, 146-158.
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Le Goff, J., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., Sichel, F., 2010. Mutagenicity and genotoxicity of PM<sub>2.5</sub> issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France) *J Appl Toxicol* 31, 131-138.
- Baccarelli, A., Vollati, B., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 21, 243-251.



- Balharry, D., Sexton, K., Bérubé, K.A. 2008. An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components: nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology* 244, 66-76.
- Barnes, P.J. 2009. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 631-638.
- Beelen, R., Raaschou-Nielsen, O., Stafoggia, M., 2013. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *The Lancet* 383, 785-795.
- Bérubé, K.A., Aufderheide, M., Breheny, D., Combes, R., Duffin, R., Clothier, R., Forbes, B., Marianna, G., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Morello, L., Morin, J.P., Seagrave, J.C., Schwartz, M., Tetley, T., Umachandran, M., 2009. In vitro models of inhalation: toxicity and disease. *J Altern Lab An* 37, 89-141.
- Bérubé, K.A., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.
- Bhowmick R., Gappa-Fahlenkamp H., 2015. Cells and culture systems used to model the small airway epithelium. *Lung* DOI 10.1007/s00408-016-9875-2
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): 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., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* 270, 144-155.
- Blasco, H., Garçon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C., Boyer, J., Devos, D., Vourc'h, P., Andres, CR., Corcia, P., 2016. Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study. *Can J Neurol Sci.*, in press.
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in vitro* 27, 533-542.
- Bozkus, F., Guler, S., Simsek, S., 2016. Serum telomerase levels and COPD exacerbations. *Respir Care* 61(3), 359-365.
- Brody, H., 2014. Lung cancer. *Nature* 513, S1
- Burgel, P.R., Bourdin, A., Chanez, P., Chabot, F., Chaouat, A., Chinet, T., deBlic, J., Devillier, P., Deschildre, A., Didier, A., 2011. Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev* 20, 7-22.
- Caramori, G., Adcock, I.M., Casolari, P., Ito, K., Jazrawi, E., Tsaprouni, L., Villetti, G., Civelli, M., Carnini, C., Chung, K.F., Barnes, P.J., Papi, A., 2011. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax* 66, 521-527.
- Clifford, R.L., Jones, M.J., MacIsaac, J.L., McEwen, L.M., Goodman, S.J., Mostafavi, S., Kobor, M.S., Carlsten, C., 2016. Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation. *J Allergy Clin Immunol*. S0091-6749(16), 30273-30281.
- Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F., Lo-Guidice, J.M., 2012. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metab Dispos* 40, 1953-1965.
- Dagher, Z., Garçon, G., Gosset, P., Ledoux, F., Surpateanu, G., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2005. Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 25, 166-175.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Activation of different pathways of apoptosis by Dunkerque city air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* 225, 12-24.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2007. Role of Nuclear Factor-kappa B Activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 27, 284-290.
- Davies, D.E., 2009. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6, 678-682.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) produced in rural-, urban-, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem Res Toxicol* 25, 904-919.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Env Res* 137, 256-267.
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J.C., Kluza, J., Laloux, C., Jonneaux, A., Petrault, M., Ryckewaert, G., Garçon, G., Rouaix, N., Duhamel, A., Jissendi, P., Dujardin, K., Auger, F., Ravasi, L., Hopes, L., Grolez, G., Sablonnière, B., Strubi-Vuillaume, I., Zahr, N., Destée, A., Corvol, J.C., Pörtl, D., Leist, M., Rose, C., Defebvre, L., Marchetti, P.,

- Cabantchik, I., Bordet, R., 2013. Targeting chelatable iron as a therapeutic option in the treatment of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 21(2), 195-210.
- Diémé, D., Cabral-N'Dior, M., Garçon, G., Billet, S., Verdin, A., Cazier, F., Courcot, D., Diouf, A., Shirali, P., 2012. Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>) collected in Dakar City, Senegal. *Environ. Res.* 113, 1-13.
- Diouf, A., Garçon, G., Diop, Y., Ndiaye, B., Thiaw, C., Fall, M., Siby, T., Kane-Barry, O., Ba, D., Haguenoer, J.M., Shirali, P., 2006. Environmental lead exposure and its relationship to traffic density among Senegalese children: a cross sectional study. *Hum Exp Toxicol* 25, 637-644.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37, 112-119.
- Freishtat, R.J., Watson, A.M., Benton, A.S., Iqbal, S.F., Pillai, D.K., Rose, M.C., Hoffman, E.P., 2011. Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dyssynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 863-869.
- Garçon, G., Shirali, P., Garry, S., Fontaine, M., Zerimech, F., Martin, A., Haguenoer, J.M., Hannotiaux, M.H., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles: assessment of cellular membrane damage and antioxidant system disruption in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol Lett* 117, 25-35.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol in vitro* 20, 519-528.
- Ghio, A.J., Dailey, L.A., Soukup, J.M., Stonehuerner, J., Richards, J.H., Devlin, R.B., 2013. Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part Fibre Toxicol* 10, 25.
- Grova, N., Salquèbre, G., Schroeder, H., Appenzeller, B.M., 2011. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.*, 2011. 24(10), 1653-1667.
- Grova, N., Salquèbre, G., Hardy, E.M., Schroeder, H., Appenzeller, B.M., 2014. Tetrahydroxylated-benzo[a]pyrene isomer analysis after hydrolysis of DNA-adducts isolated from rat and human white blood cells. *J Chromatogr A* 1364, 183-191.
- Grova, N., Hardy, E.M., Meyer, P., Appenzeller, B.M., 2016. Analysis of tetrahydroxylated benzo[a]pyrene isomers in hair as biomarkers of exposure to benzo[a]pyrene. *Anal Bioanal Chem* 408(8), 1997-2008.
- Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E., Camatini, M., 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol in vitro* 24, 29-39.
- Gualtieri, M., Øvrevik, J., Møllerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.J., Camatini, M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat Res* 713, 18-31.
- Guil, S., Esteller, M., 2009. DNA methylomes: histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 87-95.
- Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D., 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 122, 906-911.
- Ji, H., Khurana Hershey, G.K., 2012. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 129(1), 33-42.
- Kesimer, M., Kirkham, S., Pickles, R.J., Henderson, A.G., Alexis, N.E., Demaria, G., Knight, D., Thornton, D.J., Sheehan, J.K., 2009. Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L92-L100.
- Kim, K.H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International* 74, 136-143.
- Klein, S.G., Hennen, J., Serchi, Y., Blömeke, B., Gutleb, A.C., 2011. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicol in vitro* 25, 1516-1534.
- Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P., 2010. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) collected in Abidjan., Côte d'Ivoire. *J. Appl. Toxicol.* 30, 310-320.
- Lodovici, M., Bigagli, E., 2011. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol* doi, 10.1155/2011/487074
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol in vitro* 27, 551-559.

- Longhin, E., Capasso, L., Battaglia, C., Proverbio, M.C., Consentino, C., Cifola, I., Mangano, E., Camatini, M., Gualtieri, M., 2016. Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ Poll* 209, 87-98.
- Lonkar, P., Dedon, P.C., 2011. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation, reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer* 128(9), 1999-2009.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC., Lyon., France, 2013. *Lancet Oncol* 14, 1262-1263.
- Oh, M., Kim, A.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter, PM<sub>2.5</sub>-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells, BEAS-2B cells. *Mutat Res* 723, 142-151.
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J.A., Schwarze, P.E., 2015. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter, oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399-1440.
- Pezzulo, A.A., Stamer, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., McCray, Jr P.B., Zabner J., 2011. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L25-L31.
- Pillai, D.K., Sankoorikal., B.J.V., Johnson, E., Seneviratne, A.N., Zurko, J., Brown, K.J., Hathout, Y., Rose, M.C., 2014. Directional secretomes reflect polarity-specific functions in an in vitro model of human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50(2), 292-300.
- Pope, C.A. 3rd, 2014. Particulate air pollution and lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 190, 485-486.
- Prescott, J., Wentzensen, I.M., Savage, S.A., De Vivo, I., 2012. Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res* 730, 75-84.
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, N.Z., Beelen, R., 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.
- Regamey, N., Jeffery, P.K., Alton, E.W., Bush, A., Davies, J.C., 2011. Airway remodeling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* 66, 624-629.
- Rode, L., Bojesen, S.E., Weischer, M., Vestbo, J., Nordestgaard, B.G., 2013. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46 396 individuals. *Thorax* 68, 429-435.
- Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter, PM<sub>2.5</sub>. *Toxicology* 244, 220-230.
- Saint-Georges, F., Garçon, G., Escande, F., Abbas, I., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2009. Role of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in the occurrence of loss of heterozygosity in multiple critical regions of 3p chromosome in human epithelial lung cells, L132. *Toxicol Lett* 187, 172-179.
- Sawyer, K., Mundandhara, S., Ghio, A.J., Madden, M.C., 2010. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J Toxicol Environ Health A.* 73(1), 41-57.
- 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., Mutlu, G.M., De Vizcaya-Ruiz, A., Budinger, G.R., 2012. Particulate matter air pollution induces hypermethylation of the P16 promoter via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Sci Rep* 2, 275-285.
- Soukup, J.M., Dailey, L.A., Ghio, A.J., 2015. Particle retention by respiratory epithelial cells is associated with persistent biological effect. *Inhal Toxicol* 27(7), 335-341.
- Sundar, I.K., Nevid, M.Z., Friedman, A.E., Rahman, I., 2010. Cigarette smoke induces distinct histone modifications in lung cells: implications for the pathogenesis of COPD and lung cancer. *J Proteome Res* 13, 982-996.
- Tarantini, L., Bonzini, M., Apostoli, P., Pegoraro, V., Bollati, V., Marinelli, B., Cantone, L., Rizzo, G., Hou, L., Schwartz, J., Bertazzi, P.A., Baccarelli, A., 2009. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect* 117(2) 217-222.
- To, T., Zhu, J., Larsen, K., Simatovic, J., Feldman, L., Ryckman, K., Gershon, A., Lougheed, M.D., Liciskai, C., Chen, H., Villeneuve, P.J., Crighton, E., Su, Y., Sadatsafavi, M., Williams, D., Carlsten, C., and the Canadian Respiratory Research Network, 2016. Progression from Asthma to Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD; Is Air Pollution a Risk Factor? *Am J Respir Crit Care Med.* DOI: 10.1164/rccm.201510-1932OC
- Vucic, E.A., Chari, R., Thu, K.L., Wilson, I.M., Cotton, A.M., Kennett, J.Y., Zhang, M., Lonergan, K.M., Steiling, K., Brown, C.J., McWilliams, A., Ohtani, K., Lenburg, M.E., Sin D.D., Spira, A., MacAulay, C.E., Lam, S., Lam, W.L., 2014. DNA methylation is globally disrupted and associated with expression changes in chronic obstructive pulmonary disease small airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50(5), 912-922.

World Health Organization, 2014. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. Available at [www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/) viewed May 30, 2016.

Zhang, J., Ghio, A.J., Gao, M., Wei, K., Rosen, G.D., Upadhyay, D., 2007. Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest, role of G1 cyclins. *FEBS Lett* 581, 5315-5320.

Zhou, B., Liang, G., Qin, H., Peng, X., Huang, J., Li, Q., Qing, L., Zhang, L., Chen, L., Ye, L., Niu, P., Zou, Y., 2014. P53-dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE cells) by PM<sub>2.5</sub> sampled from air in Guangzhou., China. *Toxicol Mech Methods* 24, 552-559.

## Supplemental datas

**Supplemental data-Table 1: Particle-size characteristics for SRM®2786**

	Particle-size distribution					
	d(0.1) <sup>a</sup>		d(0.5)		d(0.9)	
<b>Mean particle diameter (µm)</b>	0.91		2.8		6.9	
	Mean diameter by					
	Intensity <sup>b</sup>		Volume		Number	
<b>Mean particle diameter (µm)</b>	1.1	4.9	1.1	5.1	0.9	4.9
<b>Relative frequency (%)</b>	92.2	7.8	95.3	4.7	99.9	0.1

Supplemental data-Table 1 shows the particle size characteristics for Standard Reference Material®2786 (i.e. fine particulate matter < 4µm) provided by National Institute of Standards & Technology (Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST, Certificate of analysis, Standard Reference Material®2786).

<sup>a</sup>: d(x): parameter for the particle-size distribution indicating the particle size below which x% of the volume is present.

<sup>b</sup>: intensity, volume, and number are the different analysis modes of the Zetasizer apparatus.

**Supplemental data-Table 2: Mass fraction values for inorganic elements in SRM®2786**

<b>Inorganic elements</b>	<b>Mass fraction (µg/g)</b>
Al	33840 ± 700
As	36.7 ± 1.1
Ca	73500 ± 1900
Cl	17390 ± 440
Co	19.55 ± 0.96
Cr	462.2 ± 1.5
Cs	4.01 ± 0.22
Cu	847 ± 13
Fe	48900 ± 2400
Hf	4.1
La	20.72 ± 0.68
Mg	8300
Mn	780 ± 39
Na	14920 ± 370
Sm	2.84 ± 0.09
Sc	7.2
Ti	2460 ± 140
Th	5.8
V	85.5 ± 6.5
Zn	1793 ± 88
∑ inorganic elements	203378 ± 6101

Supplemental data-Table 2 shows the mass fraction values (µg/g) for inorganic elements in Standard Reference Material®2786 (i.e., fine particulate matter < 4µm) provided by National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST, Certificate of analysis, Standard Reference Material®2786).

**Supplemental data-Table 3: Mass fraction values for selected PAHs in SRM®2786**

PAHs	Mass fractions (µg/g)
F <sup>a</sup>	0.195 ± 0.014
Fl	10.28 ± 0.36
Pyr	8.01 ± 0.22
b[ghi]Fl	3.158 ± 0.098
b[c]Phe	1.597 ± 0.052
b[a]Ant	4.82 ± 0.17
Chr	6.82 ± 0.53
bPhe	1.794 ± 0.041
b[b]Fl	7.51 ± 0.36
b[j]Fl	4.37 ± 0.32
b[k]Fl	3.48 ± 0.32
b[a]Fl	0.898 ± 0.037
b[e]Pyr	4.77 ± 0.28
b[a]Pyr	3.7 ± 0.13
Per	0.769 ± 0.02
b[ghi]Per	5.6 ± 0.41
Ipyr	4.87 ± 0.36
db[ac]Ant	0.509 ± 0.052
db[aj]Ant	0.61 ± 0.015
db[ac]Ant	0.717 ± 0.029
b[b]Chr	0.662 ± 0.022
db[ai]Phe	1.242 ± 0.031
2-mAnt	0.171 ± 0.005
Cor	2.156 ± 0.087
db[bk]Fl	1.013 ± 0.082
db[ae]Pyr	0.812 ± 0.081
ΣPAHs	74.47 ± 3.81

Supplemental data-Table 3 shows the mass fraction values (µg/g) for selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Standard Reference Material®2786 (i.e. fine particulate matter < 4µm) provided by National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST certificate of analysis Standard Reference Material®2786).

<sup>a</sup>: F: fluorene, Fl: fluoranthene, Pyr: pyrene, b[ghi]Fl: benzo[g,h,i]fluoranthene, b[c]Phe: benzo[c]phenanthrene, b[a]Ant: benzo[a]anthracene, chr: chrysene, bPhe: benzophenanthrene, b[b]Fl: benzo[b]fluoranthene, b[j]Fl: benzo[j]fluoranthene, b[k]Fl: benzo[k]fluoranthene, b[a]Fl: benzo[a]fluoranthene, b[e]Pyr: benzo[e]pyrene, BaP: benzo[a]pyrene, Per: perylene, b[ghi]Perl: benzo[g,h,i]perylene, Ipyr: indeno[1,2,3-c,d]pyrene, db[ac]Ant: dibenzo[a,c]anthracene, db[aj]Ant: dibenzo[a,j]anthracene, db[ah]Ant: dibenzo[a,h]anthracene, b[b]Chr: benzo[b]chrysene, db[ai]Phe: dibenzo[a,i]phenanthrene, Cor: coronene, db[bk]Fl: dibenzo[b,k]fluoranthene, db[ae]Pyr: dibenzo[a,e]pyrene.

**Supplemental data-Table 4: Mass fraction values for selected NPAHs in SRM@2786**

NPAHs	Mass fractions (ng/g)
3-NPhe <sup>a</sup>	32.4 ± 6
9-NPhe	12.3 ± 2.8
3-NFl	5.28 ± 0.75
7Nb[a]Ant	105 ± 4
∑NPAHs	154.9 ± 13.5

Supplemental data-Table 4 shows the mass fraction values (ng/g) for selected Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (NPAHs) in Standard Reference Material@2786 (i.e., fine particulate matter < 4µm) provided by National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST certificate of analysis Standard Reference Material@2786).

<sup>a</sup>: 3-NPhe: 3-nitrophenanthrene, 9-NPhe: 9-nitrophenanthrene, 3-NFl: 3-nitrofluoranthene, 7Nb[a]Ant: 7-nitrobenzo[a]anthracene.

**Supplemental data-Table 5: Mass fraction values for selected PCDD and PCDF congeners in SRM@2786**

Congener	Mass fractions (ng/kg)
2,3,7,8 TCDD	0.009 ± 0.001
1,2,3,7,8 PeCDD	0.049 ± 0.002
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0.043 ± 0.001
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0.081 ± 0.007
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0.079 ± 0.012
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	0.67 ± 0.013
OCDD	2.48 ± 0.07
∑PCDDs <sup>a</sup>	5.96 ± 0.11
2,3,7,8 TCDF	0.149 ± 0.01
1,2,3,7,8 PeCDF	0.123 ± 0.002
2,3,4,7,8 PeCDF	0.26 ± 0.01
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.429 ± 0.01
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.167 ± 0.004
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0.157 ± 0.004
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.013 ± 0.002
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	0.562 ± 0.01
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0.082 ± 0.001
∑PCDFs	7.33 ± 0.14
∑PCDD/Fs	13.29 ± 0.25

Supplemental data-Table 5 shows the mass fraction values (ng/g) for selected PolyChlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins (PCDD) and the PolyChlorinated Dibenzo-Furans (PCDF) congeners in Standard Reference Material@2786 (i.e., fine particulate matter < 4µm) provided by National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST certificate of analysis Standard Reference Material@2786).

<sup>a</sup>: ∑PCDDs and ∑PCDFs were calculated as the sums of Tera- (T), Penta- (Pe), Hexa- (Hx), Hepta- (Hp), and Octa (O)-chlorinated PCDDs or PCDFs, respectively.

**Supplemental data-Table 6: Mass fraction values for selected for three HBCD isomers in SRM@2786**

<b>Isomers</b>	<b>Mass fraction (ng/g)</b>
<i>alpha</i> -HBCD	150
<i>beta</i> -HBCD	61
<i>gamma</i> -HBCD	350
$\Sigma$ HBCDs	561

Supplemental data-Table 6 shows the mass fraction values (ng/g) for three Hexabromocyclododecane (HBCD) isomers in Standard Reference Material@2786 (i.e., fine particulate matter < 4 $\mu$ m) provided by National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). (Adapted from NIST certificate of analysis Standard Reference Material@2786).





## **2. Article 2 : Genetic and epigenetic alterations in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>**

**Auteurs :** B Leclercq, A Platel, S Antherieu, L.Y Alleman, E.M Hardy, E Perdrix, N Grova, V Riffault, B.M Appenzeller, M Happillon, F Nesslany, P Coddeville, J.M Lo Guidice, G Garçon.

Cet article est actuellement en soumission

### **Contexte et résultats de l'étude**

La pollution particulaire représente un véritable enjeu de santé publique puisqu'elle est associée au décès d'environ 3,7 millions de personnes dans le monde et ce, suite à des atteintes cardiaques ou pulmonaires (Beelen et al., 2013 ; Hamra et al., 2014 ; Pope., 2014 ; WHO., 2014). Parmi les atteintes pulmonaires, la pollution est liée à la cancérogenèse, notamment du poumon, et très récemment la pollution particulaire a été classée cancérogène avéré pour l'homme par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) (Groupe 1) (CIRC., 2015). Bien que l'étiologie des cancers pulmonaires soit principalement associée au tabagisme, des facteurs environnementaux sont aussi impliqués et 12.8% des décès liés aux cancers pulmonaires seraient imputables à l'exposition aux particules fines (Evans et al., 2013 ; Fajersztajn et al., 2013). Cependant, les mécanismes impliqués dans la cancérogenèse pulmonaire favorisée par la pollution particulaire restent peu élucidés et demande l'utilisation de modèles cellulaires davantage pertinents. C'est dans cette optique que nous avons développé un modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) que nous avons différenciées à l'interface air-liquide (IAL). De plus, afin de prendre en considération un degré de sensibilisé de la population, nous avons intégré un modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de patients atteints de BPCO. Ces cellules ont été exposées de manière réitérée à des PM<sub>2.5</sub> et ce à des concentrations relativement faibles (2 et 10 µg/cm<sup>2</sup>) au regard de ce qui est utilisé dans la littérature. Dans une précédente étude, nous avons montré que l'exposition de CEBH saines et issues de patients atteints de BPCO à des PM<sub>4</sub> (SRM NIST2786) s'accompagne d'une augmentation importante de l'inflammation, du

stress oxydatif mais également de la formation d'adduits à l'ADN, d'une diminution de la méthylation globale de l'ADN, d'une hyperméthylation du promoteur du gène P16, d'un raccourcissement des télomères et de l'activation de la télomérase. Ces modifications sont d'autant plus exacerbées dans les cellules BPCO ce qui démontre l'importance d'intégrer ce type de cellules afin d'évaluer l'impact de la pollution particulaire sur la santé de personnes sensibilisées (Leclercq et al., 2016). A la différence de la précédente étude qui ne prenait en compte qu'un seul patient de CEBH saines ou BPCO, nous avons décidé d'intégrer plus de sujets (5 par type cellulaire) et des les exposer à des particules fines (PM<sub>2.5</sub>) fraîchement prélevées dans le milieu urbain de Lille au cours de deux saisons contrastées. Sur ces cellules nous avons voulu mettre en avant le caractère potentiellement génotoxique des particules et l'influence qu'elles peuvent avoir sur l'epigénome. Nous avons donc montré que les PM<sub>2.5</sub> favorisent la formation d'adduits à l'ADN que cela soit des adduits aux métabolites des HAP ou lié à la formation de la 8OHdG. Toutefois, des expériences de micronoyaux et des comètes réalisées sur ces mêmes cellules, n'ont pas permis de montrer de génotoxicité des particules quelles que soient les saisons de prélèvements. Néanmoins, nous avons démontré que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> est associée à un raccourcissement des télomères, à une activation de la télomérase, une diminution de la méthylation globale de l'ADN, une hyperméthylation du promoteur du gène P16 et une diminution de l'activité de la DNMT. L'activité des HAT est augmentée et celle des HDAC est diminuée. De plus, une augmentation de la triméthylation de H3K4, une acétylation de H3K9 et H3K27 ont été observées.

L'ensemble de ces résultats démontrent de nouveau la nécessité d'utiliser des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines et d'intégrer des cultures de cellules issues de patients atteints de BPCO. Ce travail démontre également que les PM<sub>2.5</sub> induisent des adduits à l'ADN et des modifications épigénétiques à plusieurs niveaux : méthylation de l'ADN, télomères et modifications des histones.

## **Discussion et perspectives de l'article**

Cette étude, dans la continuité de l'étude précédente, met en avant l'importance de l'utilisation du modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines saines et BPCO. En effet, des études du profil génétique des CEBH cultivées à l'IAL ont permis de

montrer que ces cellules présentent des similarités de profil d'expression génique avec les cellules pulmonaires humaines directement prélevées chez le patient (Pezzulo et al., 2011). Les cellules cultivées à l'IAL et exposées aux particules atmosphériques vont présenter des effets biologiques moins prononcés que les mêmes cellules cultivées en phase immergée (Ghio et al., 2013). De plus, les CEBH-BPCO exposées à l'IAL à des  $PM_4$  présentent des réponses cellulaires exacerbées comparées aux CEBH saines avec une inflammation et un stress oxydatif importants et des modifications épigénétiques marquées (Leclercq et al., 2016). Comme discuté dans l'article précédent et pour avoir une force statistique suffisante, nous avons utilisé des cellules CEBH issues de 5 sujets sains et des CEBH issues de 5 patients BPCO. Ces 10 types cellulaires ont été exposés à des  $PM_{2.5}$  dont le Dae est inférieur aux  $PM_4$  et qui sont donc plus représentatives d'une atteinte des bronches profondes voire des alvéoles.

Les  $PM_{2.5}$  que nous avons utilisées dans cette étude ont été prélevées à Lille au cours de deux saisons contrastées (Printemps-été 2013 : PE et Automne-Hiver 2013/2014 : AH). Le site de prélèvements a été choisi pour sa situation en centre ville afin d'obtenir des particules urbaines. Lille est de plus une ville qui subit d'importants pics de pollution et présente des concentrations moyennes en  $PM_{2.5}$ , mesurées par une station de l'ATMO NPDC, de  $16.8 \pm 10.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour l'AH et de  $16.6 \pm 8.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  pour le PE. Alors que la commission européenne, dans la directive 2008/50/CE, a fixé le plafond de concentration moyenne annuelle des  $PM_{2.5}$  à  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  et que pour garantir la santé publique, l'OMS recommande de ne pas dépasser les  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $PM_{2.5}$ . Même si les campagnes de prélèvements ont duré presque 1 an, les conditions de prélèvement et de stockage des  $PM_{2.5}$  ont pu être maîtrisées et les particules ont rapidement été utilisées pour les études de toxicologie. La composition en métaux montre une concordance avec d'autres analyses chimiques réalisées sur des particules d'autres villes de la région NPDC dont Dunkerque (Mbengue et al., 2014 ; Dergham et al., 2015). Cependant, les HAP mesurés présentent des concentrations plus importantes que ceux quantifiés dans d'autres villes de la région NPDC mais il est possible que cela soit lié à la différence de taille des villes et également, à la durée d'échantillonnage, aux conditions climatiques ou encore aux différentes sources d'émission des particules (trafic automobile par exemple).

Les concentrations de  $2 \mu\text{g}$  de  $PM_{2.5} / \text{cm}^2$  comme dose non-cytotoxique et de  $10 \mu\text{g}$  de  $PM_{2.5} / \text{cm}^2$  comme dose faiblement toxique ont été choisies suite à des études cytotoxiques et

ont été utilisées pour les études toxicologiques. Ces concentrations font partie des concentrations les plus faibles reportées dans la littérature et qui entraînent des effets biologiques suffisants (Boublil et al., 2013 ; Longhin et al., 2013 ; Leclercq et al., 2016). Les analyses de HAP réalisées sur les particules prélevées au cours des deux saisons montrent une concentration plus importante durant l'AH que le PE (6.86 et 1.86µg/g respectivement). En accord avec ces résultats, les concentrations de HAP et de leurs métabolites mesurées dans les cellules exposées aux PM<sub>2.5</sub> sont plus importantes dans celles exposées aux PM<sub>2.5</sub> de la saison AH, cette différence étant moins marquée pour les concentrations en B[a]P et ses métabolites. Néanmoins, en accord avec nos précédents résultats, les cellules BPCO présentent une quantité moindre de métabolites totaux des HAP et plus particulièrement pour les métabolites du B[a]P. De même, la formation d'adduits à l'ADN par le OH-B[a]P ou la formation de 8OHdG sont plus importants dans les cellules BPCO traitées par les particules issues de la saison AH. Le métabolisme des cellules BPCO est probablement moins efficace du fait de leur état pathologique. De plus, comme montré dans nos précédents résultats, les cellules BPCO présentent une expression des enzymes de phase 1, dont le CYP1A1 et le CYP1B1, diminuée (Leclercq et al., 2016).

Même si la présence d'adduits à l'ADN est clairement plus importante dans les cellules traitées aux PM<sub>2.5</sub> avec des différences marquées selon la concentration, le temps d'exposition, la saison ou le type cellulaire, nous n'avons pas observé d'effets clastogènes (cassures chromosomiques) ou aneugènes (perte d'une partie de chromosomes). Cependant, beaucoup d'études qui s'intéressent à la génotoxicité des particules s'effectuent à partir d'extractions de matière organique ou utilisent des cellules transformées pour réaliser ces essais (Lepers et al., 2014). La longueur des télomères et l'activité de la télomérase ont été évalués dans les CEBH saines et BPCO exposées aux PM<sub>2.5</sub> issues des 2 saisons et le raccourcissement des télomères ainsi que la réactivation de la télomérase sont mesurés et ce de manière plus marquée dans les cellules BPCO. Les télomères sont retrouvés raccourcis dans les cellules de patients atteints de BPCO, ceci étant probablement lié à la déstabilisation de la balance oxydant/antioxydant (Houben et al., 2009). L'activité de la télomérase est trouvée augmentée dans les cellules issues de patients atteints de BPCO ou de cancers pulmonaires (Fernandez-Marcelo et al., 2015 ; Bozkus et al., 2016). Ces différents résultats laissent penser, même si dans nos conditions d'exposition nous ne mesurons pas d'effets clastogènes ou aneugènes, que les PM<sub>2.5</sub> jouent un

rôle génotoxique par la formation d'adduits à l'ADN ou le raccourcissement des télomères et l'activation de la télomérase. Il est probable, au vu des faibles quantités de HAP ou d'autres polluants toxiques (métaux, dioxines, furanes, etc) contenus dans les particules, que les temps d'exposition pour détecter des effets clastogènes ou aneugènes ne soient pas suffisamment longs. Il serait intéressant d'évaluer ces effets sur des périodes d'exposition plus longues.

En parallèle des dommages génomiques nous nous sommes intéressés aux dommages épigénomiques. Nous avons mesuré une diminution de la méthylation globale de l'ADN, une hyperméthylation du promoteur du gène P16 et une diminution de l'activité DNMT dans les CEBH saines, de manière plus importante dans les CEBH BPCO et ce en accord avec nos précédents résultats. En effet, le profil de méthylation de l'ADN, induit suite à l'exposition aux PM, est associé à la génération d'espèces réactives de l'oxygène notamment par les métaux de transition. Ces dommages oxydatifs peuvent empêcher la liaison des DNMT avec l'ADN et donc altérer la méthylation sur certains sites (Wang et al., 2012). Contrairement à l'étude précédente, nous avons mesuré des différences de méthylation et d'acétylation, de l'histone H3 (H3K4me3, H3K9ac) et uniquement dans cette étude des variations d'acétylation et de phosphorylation de H3 (H3K27ac, et H3S10ph). Des variations d'activité pour les HDM, HAT et HDAC sont également détectées dans les CEBH saines ou BPCO exposées aux PM<sub>2.5</sub> aux concentrations et temps d'exposition les plus longs. Les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et d'autres mécanismes épigénétiques agissent de concert pour la mise en place et le maintien de l'activité des différents gènes. Les modifications des histones peuvent influencer le degré de compaction de l'ADN et donc l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle au niveau des promoteurs de certains gènes. La méthylation de l'ADN favorise l'expression ou au contraire la répression de certains gènes. Leur dérégulation est impliquée dans la carcinogenèse, et des modifications des profils de méthylation peuvent favoriser la transposition d'ADN ou la formation de recombinaisons favorisant l'instabilité génomique (Ostertag et al., 2003 ; Han et al., 2004). De même des modifications des histones peuvent favoriser l'expression de certains gènes dits oncogènes ou réprimer des gènes dits suppresseurs de tumeur (Chervona et al., 2012).

Ces résultats mettent de nouveau en avant la nécessité d'utiliser des modèles de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines et d'intégrer dans les études de

toxicologie des particules des cellules issues de patients atteints de différentes pathologies dont la BPCO. De plus cette étude souligne l'importance de prendre en considération la saisonnalité des particules qui peuvent présenter des caractéristiques chimiques différentes et donc induire des réponses biologiques différentes. Les  $PM_{2.5}$  prélevées à Lille au cours des saisons AH et PE sont capables d'induire des adduits à l'ADN, un raccourcissement des télomères, la réactivation de la télomérase mais également des modifications épigénétiques telles que la diminution de la méthylation globale de l'ADN ou encore des modifications des histones. Par conséquent, toutes les dérégulations que nous avons mesurées suite à l'exposition aux PM sont communes à celles retrouvées dans la cancérogenèse et laissent penser que la carcinogenèse induite par les particules peut être au moins en partie due à ces modifications.

# GENETIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN HEALTHY AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASED HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS REPEATEDLY EXPOSED TO AIR POLLUTION-DERIVED PM<sub>2.5</sub>

LECLERCQ B<sup>1,2</sup>, PLATEL A<sup>1</sup>, ANTHÉRIEU S<sup>1</sup>, ALLEMAN LY<sup>2</sup>, HARDY EM<sup>3</sup>, PERDRIX E<sup>2</sup>, GROVA N<sup>3</sup>, RIFFAULT V<sup>2</sup>, APPENZELLER BM<sup>3</sup>, HAPILLON M<sup>1</sup>, NESSLANY, F<sup>1</sup>, CODDEVILLE P<sup>2</sup>, LO GUIDICE J-M<sup>1</sup>, GARÇON G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, FRANCE

<sup>2</sup> Mines de Douai, SAGE, CS10838, F-59508 Douai, FRANCE

<sup>3</sup> Human Biomonitoring Research Unit, Luxembourg Institute of Health, L-4354 Esch-sur-Alzette, LUXEMBOURG

**Corresponding Author:** Pr Guillaume GARÇON, EA4483, Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse, BP83 59006 Lille Cedex, France. Tél: +33-362283030; E-mail: guillaume.garcon@univ-lille2.fr

## ABSTRACT

Even though clinical, epidemiological and toxicological studies have progressively provided a better knowledge of the underlying mechanisms by which air pollution-derived particulate matter (PM) exerts its harmful health effects worldwide, new *in vitro* studies on relevant cell systems are still needed. Hence, in the aim of getting closer to the human *in vivo* conditions, primary cultures of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, with the cells being grown at the air-liquid interface, were used in this work. Thereafter, healthy and COPD-diseased HBE cells were repeatedly exposed to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>, collected in Lille (France) during two contrasted seasons (i.e., autumn-winter, AW; and spring-summer, SS), in order to better determine whether genetic and/or epigenetic endpoints will closely interact. Despite the concentration-, exposure- and season-dependent increases of the concentrations of PAHs, PAH metabolites, B[a]P, and, in particular, OH-B[a]P metabolites in NHBE cells, and to a lesser extent in COPD-DHBE cells, there was a more pronounced OH-B[a]P DNA adduct and 8-OHdG formation in the COPD-diseased HBE cells. However, no increase in primary DNA strand breaks nor chromosomal aberrations were reported in repeatedly exposed healthy and COPD-diseased HBE cells. Telomere length and telomerase activity were respectively reduced and increased in a concentration- and exposure-dependent manner in NHBE and in particular COPD-DHBE cells. In addition to DNA damages which induce genetic abnormalities, there were a global DNA hypomethylation, a *P16* gene promoter hypermethylation, and a decreasing DNA methyltransferase activity in NHBE and notably COPD-DHBE cells repeatedly exposed to the PM<sub>2.5</sub> samples. Changes in site-specific methylation, acetylation, and phosphorylation of histone H3 (i.e., H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, and H3S10ph), on the one hand, and in histone demethylase, histone acetyltransferase, and histone deacetylase activities, on the other hand, occurred in a concentration- and exposure-dependent manner in healthy and COPD-diseased cells repeatedly exposed. By studying genetic and epigenetic endpoints in these healthy and diseased HBE cell models repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>, we not only highlighted the key role played by all these genetic and epigenetic mechanisms but also the difference in their responsiveness.

**KEYWORDS:** Air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>; human bronchial epithelial cells; healthy and COPD phenotypes; genetic and epigenetic hallmarks



## INTRODUCTION

In 2012, the world health organization (WHO) reported that around 7 million people which represent one in eight of total global premature deaths worldwide, died as a result of air pollution exposure. This finding more than double previous estimates and confirms that air pollution is now the world's largest single environmental health risk (WHO, 2014). However, air pollution-derived particulate matter (PM) is specifically responsible for 3.7 million premature deaths, through the induction of cardiopulmonary diseases and lung cancers (Beelen et al., 2013; Hamra et al., 2014; Jerrett et al., 2016; Pope, 2014; Raaschou-Nielsen et al., 2016; WHO, 2014). In 2013, an expert's working group unanimously classified outdoor air pollution and outdoor air pollution-derived particulate matter (PM) as carcinogenic to humans (IARC Group 1) based on sufficient evidence of carcinogenicity in humans and experimental animals, and strong mechanistic evidence (IARC, 2015). Although, most of lung cancers can be attributed to direct inhalation of tobacco smoke, about one quarter of lung-cancer cases worldwide occurred in people, who had never smoked. Several factors, not only genetic but also environmental, such as PM, may also be the cause of these lung cancers among non-smoking people (Brody, 2014). More than 80% of people living in an air pollution monitored urban area are exposed to air quality levels that exceed recommended WHO limits (WHO, 2016). In spite of notable improvements in some regions, the global air pollution levels had increased by 8%. That is why, the WHO is trying to establish new limits, which will be safer for human health (WHO, 2013). In an effort to improve ambient air quality, awareness is now paid to the need to re-evaluate the environmental quality standards, aiming not only at lower PM concentration thresholds, but also focusing on specific reduction of PM toxicity (Casseo et al., 2013). However, PM is a heterogeneous and complex mixture of particles, originating from a myriad of natural and anthropogenic sources, whose chemical composition varies over space and time, showing the diversity of sources and the effect of atmospheric processes (Loomis et al., 2013).

Even though clinical, epidemiological and toxicological studies have progressively provided a better knowledge of the underlying mechanisms by which air pollution-derived PM exerts its harmful health effects worldwide, new *in vitro* studies on relevant cell systems are still needed. Novel tissue-engineering tools have been recently developed to help in recapturing the native lung environment *ex vivo*. These models are now available for all the major respiratory tract areas and constitute a very useful and powerful promising *in vitro* tool in the field of the respiratory toxicology, which also allows taking into account sensitive individuals (Bérubé et al., 2010). With the aim of getting closer to the human *in vivo* conditions, we have already developed a primary culture model of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, with the cells being grown at the air-liquid interface (ALI) (Leclercq et al., 2016). These innovative *in vitro* models integrate a number of factors related to pre-existing chronic pulmonary inflammatory and also allow to obtain a differentiation state, as close as possible, to the cell exposure conditions reported *in vivo*. Thereafter, we used an original experimental strategy of human bronchial epithelial (HBE) cells, which were repeatedly exposed to relatively low doses of PM not only to evaluate the cytotoxic, oxidative, inflammatory, metabolism, and epigenetic status, but also to better demonstrate the difference in their responsiveness to air pollution-derived PM (Leclercq et al., 2016). The use of such innovative *in vitro* exposure systems and particularly the use of COPD-DHBE cells could therefore be considered as a very useful, powerful and promising tool in the field of respiratory toxicology.

As argued by other authors, we supported that, after single short-term exposure of lung cell lines to air pollution-derived PM, oxidative stress, inflammation, genotoxicity, and cell cycle deregulation were the main adverse cell outcomes (Abbas et al., 2009; 2010, 2013, 2016; André et al., 2010; Billet et al., 2007, 2008; Dagher et al., 2005, 2006, 2007; Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Lepers et al., 2014; Saint-Georges et al., 2008, 2009). However, to date, only few works have been performed using innovative *in vitro* exposure systems such as HBE cell models repeatedly exposed to air-pollution-derived PM to better evaluate their longer-term effects (Boublil et al., 2013; Leclercq et al., 2016; Loxham et al., 2015). All the above-mentioned processes also play an important role in air pollution-derived PM lung diseases, such as asthma, allergy, COPD, and cancer induction but multiple different molecular pathways can concurrently be triggered. Cancer is a complex and multifactorial disease which is initiated by a multistep process with genetic changes. Therefore, key oncogenes and tumor suppressor genes are frequent targets of genetic alterations that enable cells to escape growth control and to bear malignant features by disrupting central signaling pathways and networks (Hanahan and Weinberg, 2011). Air pollution-derived PM expositions are linked to genetic alterations (for review, see also CIRC, 2015). Nevertheless, the underlying mechanisms by which PM-induced genetic changes in lung cells can cause adverse health effects are still not totally clear. Accumulating evidences from our previous works revealed that the fine fraction of the PM (i.e., particles with aerodynamic diameter less than 2.5 $\mu\text{m}$ , PM<sub>2.5</sub>) are mainly composed of combustion-derived particles with a high redox capacity and with a relatively high level of organic (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs; polychlorinated dibenzo-p-dioxin and furans, PCDD/Fs; dioxin-like and marker polychlorinated biphenyls, DL- and M-PCBs) and inorganic (e.g., metals) chemicals, which are mainly responsible for the reported health

effects. Among them, two main types of DNA lesions have been described (Genies et al., 2013). Firstly, the oxidative stress related to xenobiotic-metabolism enzyme activity or to metabolite or transition metal redox properties can induce DNA strand breaks and oxidized bases (i.e., 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG). Secondly, highly biologically reactive metabolites-related to phase I enzyme activity can also link DNA bases yielding to DNA adducts (CIRC, 2015). Moreover, telomeres, a complex of DNA tandem repeats, protect chromosomes from nucleolytic degradation, end-to-end fusion and breakage-fusion-bridge cycles (Zhang et al., 2013). Telomeres shorten with age and this process can be accelerated by the exposure to several environmental factors, known to cause oxidative stress and chronic inflammation (Grahame and Schlesinger, 2012). Accordingly, recent studies supported that telomere length (TL) modifications are associated with diseases, such as cancers. Oxidative stress and inflammation, two important pathways involved in carcinogenesis, also represent a high risk factor for telomere shortening (Zhang et al., 2013). Telomeres integrity is mostly maintained by an enzyme named telomerase which plays a key role against chromosomes erosion by adding hexameric repeats to the telomeric ends of the chromosomes. Therefore, telomeric DNA is dynamic, and TL is considered to be the result of a balance between telomere shortening and lengthening processes (Kordinas et al., 2016). Moreover, the epigenome can be impaired during cancer development and epigenetic's modifications are as significant as the genetic's ones (Esteller, 2011). Evidence for a close link between the genetic and epigenetic events has recently emerged; in other words, genes that directly control the epigenome are also frequent targets of activating or inactivating mutations (Li et al., 2015).

The current field of epigenetics includes a number of mechanisms, and notably DNA methylation and histone modifications (Baccarelli and Bollati, 2009). DNA methylation is a covalent modification, heritable by somatic cells after cell division, primarily found on CpG dinucleotides, and closely involved in regulating many cellular processes, including chromatin structure and remodeling, genomic imprinting, chromosome stability, and gene transcription (Liu et al., 2015). Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is one of the most common and well-characterized transposable sequence and LINE-1 methylation measurement which have been used to estimate global genomic DNA methylation content. Global hypermethylation, as well as hypomethylation of transposable repetitive elements, has been associated with reduced chromosomal stability and altered genome function (Herceg and Vaissière, 2011; Ji et al., 2012; Liu, 2015). The methylation state is actively maintained by DNA methyltransferases activity (DNMTs). DNMT1 facilitates replication of the DNA methylation pattern, and DNMT3a and DNMT3b mediate de novo methylation. The mechanisms underlying cytosine demethylation remain unclear and may, in part, be a result of the binding reduction of the methylated DNA-binding proteins to the susceptible CpGs or CpG islands. Histones are essential to the DNA compaction and covalent histone modifications, such as methylation or acetylation and they have shown to play an essential role in gene expression regulation by modulating chromatin structure (Liu, 2015). These posttranslational modifications are regulated by enzymes such as histone acetyltransferases (HATs), deacetylases (HDACs), methyltransferases, and demethylases (HDMs) (Ho, 2012). H3 and H4 histones have long tails which can be covalently modified to allow DNA and nuclear proteins binding changes which lead to chromatin structure and gene expression modulations. Epigenetic dysregulation including histone modifications and DNA methylation are also increasingly being associated with air pollutants, including air pollution-derived PM expositions (Christensen and Marsit, 2011). Histone modifications also work in concert with DNA methylation to regulate acute and persistent changes in transcriptional programs through reorganization of the chromatin architecture (Chen, 2015).

Hence, the aim of the present study is to better determine whether genetic and/or epigenetic endpoints will closely interact in primary culture models of NHBE and sensitive COPD-DHBE cells repeatedly exposed to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>, collected during two contrasted seasons (i.e., autumn-winter, AW; and spring-summer, SS). After having checked the cytotoxicity, genetic and/or epigenetic endpoints were also investigated, through the determination of oxidative and benzo[a]pyrene (B[a]P)-related DNA adducts (i.e., 8-OHdG, and OH-B[a]P DNA adducts), primary DNA and chromosomal damages (i.e., *in vitro* comet assay, and *in vitro* micronucleus test, respectively), telomere integrity (i.e., TL and telomerase activity), DNA methylation (i.e., LINE-1 methylation, P16 and RB gene promoter methylation, and DNMT activity), and histone H3 post-translational modifications (i.e., H3K4me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, H3K27me2, H3K27me3, H3K27ac, H3S10ph; and HAT, HDAC, and HDM activities).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **CHEMICALS**

All the culture reagents we used for the proliferation and differentiation at ALI of NHBE and COPD-DHBE cells were provided by LONZA (Verviers, Belgium). Chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability was from Promega (Charbonnière-les-Bains,

France). Vybrant Cytotoxicity Assay Kit and all the molecular biology reagents were from Thermo-Scientific (Illkirch, France). Normal and low- melting point agaroses were from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). QIAamp DNA Mini Kits were from Qiagen (Courtaboeuf, France). Merck-Millipore (St Quentin-en-Yvelines, France) provided CpGenome Direct Prep Bisulfite Modification Kit, CpG WIZ® PI6 and RB1 Amplification Kits, and TRAPeZe® RT Telomerase Detection Kit. Highly Sensitive 8-OHdG Check was from Gentaur France SARL (Paris, France). Global DNA Methylation LINE-1 Assay, DNMT Assay kit, Histone Purification Mini Kit, Histone H3 PTM Multiplex Assay, and HAT, HDAC, and HDM Assay kits were from Active Motif (La Hulpe, Belgium).

## METHODS

### 2.1 Field campaign and PM<sub>2.5</sub> sampling description

Air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> samples were collected during two distinct seasons (i.e., AW and SS) from April 2013 to July 2013 and from November 2013 to April 2014, respectively, in the center of Lille (France). The Lille city has a population of 230,000 inhabitants (density: 6600 inhab/km<sup>2</sup>) while the metropolitan area represents more than 1.1 million inhabitants. The sampling site (50°37'53.2"N; 3°04'31.5"E) is surrounded by medium-sized buildings and located less than 500m from a high traffic road (N265) and a large train station. During these two campaigns, the average PM<sub>2.5</sub> mass concentrations, measured at a sampling site nearby (i.e., Lille Fives) by the Atmo NPdC's regional air quality monitoring network, were 16.8±10.1µg/m<sup>3</sup> and 16.6±8.4µg/m<sup>3</sup> for the AW and SS seasons, respectively. The high volume cascade impactor sampler (Tish Environmental Inc., Village of Cleves, OH, USA) we used was localized on the rooftop of a building and operated at 35m<sup>3</sup>/h on 6 stages from 0.39µm to 10.2µm. Only the last 3 stages collecting particles below 2.1µm (i.e., also named PM<sub>2.5</sub> in this paper) were retrieved. Collected particles were directly weighed, homogenized, and kept at -20°C until sub-sampling for chemical and toxicological studies. The total masses of PM<sub>2.5</sub> were 808mg and 226mg during the AW and SS seasons, respectively.

### 2.2 PM<sub>2.5</sub> physical and chemical characterization

Size distributions of the two PM<sub>2.5</sub> samples (i.e., AW and SS PM<sub>2.5</sub>) were studied using a Zetasizer Nano ZSP™ (Malvern Instruments SARL, Orsay, France). Metal analyses were performed using inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES; IRIS Intrepid, Thermo-Scientific) and -mass spectrometry (ICP-MS; NeXion 300x, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) (Alleman et al., 2010). Briefly, three small aliquots of about 1.2mg of PM<sub>2.5</sub> were sub-sampled for total metal concentrations analyses. They were digested in a mixture of ultrapure reagents (i.e., 8mL HNO<sub>3</sub>, 0.5mL HF, 2mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 200°C, with a microwave oven (Milestone ETHOS, Milestone SRL, Sorisole, Italy); thereafter, the digest's products were adjusted to a final volume of 50mL ultrapure water and stored at 4°C until analysis. Samples of SRM-2584 (i.e., Indoor Dust; NIST, Gaithersburg, MD, USA) were systematically used as standard reference material to validate the extraction procedure. The methodology and quality control measurements for total metal concentration analysis have been described by Mbengue et al. (2014). Pressurized liquid extraction of PAHs contained in PM<sub>2.5</sub> samples was performed with a Dionex ASE 200 instrument (Thermo-Scientific) using a stainless-steel 11-mL cell containing the particles to be extracted (i.e., 11.4 and 6.2mg for the AW and SS seasons, respectively) and acetonitrile as a solvent. The extract was further evaporated for enrichment under a gentle stream of nitrogen in a water bath held at 60°C (Zymark TurboVap II) to a final volume of 500-1000µL. The analysis method by high-pressure liquid chromatography (HPLC) consisting of a Waters 2695 Alliance system (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) coupled to an on-line 996-photodiode array and a 2475-fluorimetric detector is detailed elsewhere (Crenn et al., 2016). Recovery efficiencies and analytical limit of detection were assessed for each PAH using certified sample (i.e., SRM-1649a, Urban Dust; NIST). High resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HR-GC/HR-MS) after accelerated solvent extraction were used to quantify PCDD/Fs and DL- and M-PCBs within the two bulk PM<sub>2.5</sub> samples (Billet et al., 2008).

#### **NHBE and COPD-DHBE cell culture and PM<sub>2.5</sub>-exposure**

NHBE and COPD-DHBE cells (LONZA) were respectively established from biopsies isolated from five healthy and five COPD-diseased donors, respectively. The characteristics of the healthy and COPD-diseased donors and HBE cells are shown in Table 1; except for the smoking habits, no significant difference was reported between the characteristics of the healthy and COPD-diseased status. Cells were cultured in 95% humidified air with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in 75cm<sup>2</sup> CellBIND® surface plastic flasks (Corning; Sigma-Aldrich), in supplemented bronchial epithelial cell basal medium, also called bronchial epithelial growth medium (BEGM™; Bronchial

Epithelial BulletKit™, LONZA). For all the toxicological endpoint study, except genetic events, healthy and COPD-diseased cells were seeded at 30,000 cells/cm<sup>2</sup> on Transwell® polyester permeable membrane cell culture 24mm inserts in 6-well Transwell® microplate supports (Corning). Permeable membrane inserts we used were a treated-polyester tissue with a membrane thickness of 10µm and a pore size of 0.4µm. Once cells had reached confluency, ALI conditions were established by replacing the medium by a supplemented bronchial air liquid interface medium with 0.2% (v/v) B-ALI™ inducer, also called bronchial air liquid interface differentiation medium (B-ALI™; B-ALI BulletKit™, LONZA). Thereafter, NHBE and COPD-DHBE cells were exposed at ALI one or three times, for 4h, at 24h intervals, to controls (i.e., sterile HBSS, 500µL) or AW and SS PM<sub>2.5</sub>exposed cells (i.e., concentrations ranging from 1 to 20µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup>, suspended in sterile HBSS, 500µL). Just before cell exposure, air pollution-derived AW and SS PM<sub>2.5</sub> were suspended at concentrations ranging from 2 to 40µg/mL in sterile HBSS supplemented with amphotericin B (20µg/mL) at 2% (v/v), and were thereafter sonicated for 2x1 min. Twenty-four hours after exposure, 1 mL-aliquots of cell-free culture media were collected and quickly frozen at -80°C until the further study of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Adherent cells were washed once with 1mL-aliquots of cold sterile PBS, and quickly frozen at -80°C until the further study of the other toxicological endpoints. For the study of primary DNA damage by the alkaline comet assay, NHBE and COPD-DHBE cells were cultured at ALI and exposed to air pollution-derived AW and SS PM<sub>2.5</sub> for 4 h without any recovery time. HBE cells-exposed to methyl methanesulfonate (MMS; 15µg/mL) served as positive controls. For the alkaline comet assay, cytotoxicity was assessed at harvest using the Trypan Blue dye exclusion assay. Results were expressed as percent of cell survival (i.e. the percent ratio of viable unstained cells to non-viable stained cells in exposed versus control groups). Concentrations which led to more than 70% of viability were then submitted to a genotoxicity assessment. Because of the absolute need of proliferative cells for the study of chromosomal aberrations by the *in vitro* micronucleus test, NHBE and COPD-DHBE cells were kept undifferentiated and therefore grown submerged in BEGM™ cell culture medium. Indeed, HBE cells were seeded at 15,000 cells/cm<sup>2</sup> on 6-well Cellbind® microplates (Corning) and incubated for 3 days prior to exposure to air pollution-derived AW and SS PM<sub>2.5</sub> in order to allow exponential cell growth and maximum cell attachment. Cells were treated for 24 h, then washed twice with PBS, immediately suspended in BEGM™ cell culture medium and incubated at 37°C for an additional 5 day recovery period. . For the *in vitro* micronucleus test, cytotoxicity was evaluated by calculating the percentage of relative population doubling (RPD) where  $PD = [\log(\text{post-treatment cell number}/\text{initial cell number})]/\log(2)$ , as recommended by OECD test Guideline 487 (OECD, 2014). Concentrations which led to a RPD greater than 45±5% were considered as having low or no cytotoxicity and were then submitted to genotoxicity assessment. HBE cells-exposed to mitomycin C (MMC; 0.25µg/mL) served as positive controls.

### Toxicological endpoints

Twenty-four hours after the last exposure, cytotoxicity in NHBE and COPD-DHBE cells was evaluated through the determination of ATP concentration (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability, Promega) in cells and extracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity (Vybrant Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) in cell-free culture media. The further study of the other toxicological endpoints needed the preparation of different cell lysates: (i) B[a]P and its metabolites, OH-B[a]P DNA adducts, histone H3 post-translational modifications, and DNMT, HAT, HDAC, HDM activities were studied after cell lysis with RIPA buffer (Sigma-Aldrich), (ii) 8-OHdG, global DNA methylation, P16 promoter methylation, and TL were studied after DNA extraction with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), (iii) telomerase activity was studied after cell lysis with CHAPS buffer (Sigma-Aldrich), and (iv) alkaline comet assay and *in vitro* micronucleus test were studied in viable cells. Oxidative DNA adduct 8-OHdG concentration was studied using a commercially available enzyme immunoassay (Highly Sensitive 8-OHdG Check, Gentaur France SARL), as published elsewhere (Dergham et al., 2015). The methods developed for the analysis of PAHs and their OH-metabolites in cell lysates, on the one hand, and for the analysis of 4 tetrahydroxylated-B[a]P isomers released from cell DNA hydrolysis in acidic conditions, on the other hand, were based upon gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and have been adapted from Grova et al. (2011, 2014, 2016). All these analyses were carried out with an Agilent 7890A GC equipped with an HP-5MS capillary column (30m, 0.25mm i.d., 0.25µm film thickness), coupled with an Agilent 7000B triple quadrupole mass spectrometer operating in electron impact ionization mode, and an Agilent CTC PAL autosampler. The comet assay was performed under alkaline conditions (pH>13) in compliance with previously described protocol (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Briefly, slides were independently coded and analyzed blind after addition of 25 µL of propidium iodide (20 µg/mL). Slides were then observed at 250x magnification using a fluorescence microscope (Leica Microscopy and Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Switzerland) equipped with an excitation filter of 515-560nm and an emission filter of 590nm, connected through a gated CCD camera to Comet Image Analysis System software, version 4.0 (Perceptive Instruments Ltd., Haverhill, United Kingdom). Four hundred randomly selected cells per exposure were scored. Tail intensity, defined as the percentage of DNA that had migrated from the head of the comet into the tail, was

used as the measure of DNA damage. For the *in vitro* micronucleus test, briefly, after the hypotonic shock (i.e., BEGM diluted 1:3 v/v in distilled water, 2 mL/tube, 10 min) and the pre-fixation step (i.e., cold Carnoy mixture: ethanol/acetic acid, 3:1 v/v, 500µl/tube), cells were twice fixed (i.e., cold Carnoy mixture, 2mL/tube). Cells were spread on glass slides, air-dried at room temperature, and stained for 10 min with 2% (v/v) Giemsa water solution. For each exposure, 4 duplicate slides were prepared. Slides were independently coded and analyzed blind. MN, identified according to recommended criteria (Fenech, 2003; Fenech et al., 2007; Miller et al., 1995), were scored in 1000 intact mononucleated cells per slide (i.e., 4000 mononucleated cells/exposure) at 500x magnification. TL was studied using monochrome multiplex quantitative PCR method, as published elsewhere (Cawthon et al., 2009). Telomerase activity was studied using the TRAPEze® RT Telomerase Detection Kit, (Merck-Millipore). The Global DNA Methylation LINE-1 Assay and DNMT Assay provided a measure of global DNA methylation shifts and DNMT activity in NHBE and COPD-DHBE cells, respectively (Active motif). The CpGenome Direct Prep Bisulfite Modification Kit provided bisulfite conversion and the CpG WIZ® P16 and RB1 Amplification Kits were used for determining the methylation status of the P16 and RB1 gene promoters by methylation-specific PCR, respectively (Merck-Millipore). Active Motif's Histone Purification Mini Kit was used to purify core histones (i.e., H2A, H2B, H3, and H4) as one total population while preserving their post-translational modifications, and specific H3 modifications (i.e., H3K4me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, H3K27me2, H3K27me3, H3K27ac, H3S10ph) were studied by using Histone H3 PTM Multiplex Assay (Active Motif). HAT, HDAC, and HDM assays were used for determining HAT, HDAC, and HDM activities, respectively (Active motif).

### Statistical analysis

Cytotoxicity data were analyzed with the GraphPad Prism6 Software (v6.01) (GraphPadSoftware Inc., USA). For the other toxicological endpoints, except genotoxic events, NHBE and COPD-DHBE cells exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> were compared with those from controls (i.e., sterile HBSS) using the Mann-Whitney U-test, with *p* value correction for multiple comparisons. Statistical analyses were carried out with the IBM SPSS Software (v20) (IBM SPSS Software, Inc., USA). While it has previously been shown that the tail intensity measured in the Comet assay does not follow a Gaussian distribution (Bauer *et al.*, 1998), the Mann-Whitney U-test was used to evaluate the statistical difference between groups (i.e., between each exposure versus controls). For the *in vitro* micronucleus test, the statistical significance of difference between groups (i.e., each exposure versus controls) was determined using the CHI-squared test. The concentration related increase was also evaluated with an ANOVA trend test. Statistical analyses for comet assay and *n vitro* micronucleus test were performed using the statistical StatView® Software (v5.0) (SAS Institute Inc., USA). Statistically significant differences were reported with *p* values <0.05.

## RESULTS

### Physical and chemical characteristics of the PM<sub>2.5</sub> samples

The size distributions of PM<sub>2.5</sub> samples, as evaluated by their volume, and number, were 1214 nm (95.9%), and 172.3 nm (73.9%) for the AW season (i.e., AW PM<sub>2.5</sub>), and 1215 nm (91.5%), and 184.5 nm (92.7%) for the SS season (i.e., SS PM<sub>2.5</sub>), respectively (Table 2). Their elemental compositions showed not only some elements usually associated with natural environment (e.g., Al, Ca, Na, Mg, Ti, Sr), but also so-called anthropogenic elements (e.g., Ba, Cr, Cd, Cu, Fe, Ni, Mn, Pb, Zn) (Table 3). Among them, Al, Ca, Cu, Fe, Na, Si Ti, and Zn were the most abundantly present (i.e., >1000 µg/g). Moreover, several congeners of PAHs, PCDD/Fs, and DL- and M-PCBs were detected within the two PM<sub>2.5</sub> samples (Table 3). Overall, the concentrations of inorganic elements and organic compounds were higher in the PM<sub>2.5</sub> sample from the AW season as compared to this from the SS season (i.e., ∑inorganic elements: 207,004 *versus* 160,246µg/g, ∑PAHs: 69.4 *versus* 25.4µg/g, ∑PCDDs: 13.9*versus* 11.5µg/g, ∑PCDFs: 6.37 *versus* 4.45µg/g, ∑DL-PCBs: 44.5 *versus* 24.3µg/g, and ∑M-PCBs: 233 *versus* 158µg/g).

### Cytotoxicity in PM<sub>2.5</sub>-exposed NHBE and COPD-DHBE cells

AW and SS PM<sub>2.5</sub> exposure induced dose- and time-dependent decreases of ATP concentration in NHBE and COPD-DHBE cells, as shown in Figure 1. Statistically significant decreases of ATP concentration were observed after one exposure to AW and SS PM<sub>2.5</sub> only at their highest concentrations (i.e., 20µg/cm<sup>2</sup>, *p*<0.05) (Figure 1-A, C, E, and G). After three exposures to AW and SS PM<sub>2.5</sub>, significant decreases of ATP concentration, higher than those above-reported, were observed for the two highest concentrations (i.e., 10 and 20µg/cm<sup>2</sup>, *p*<0.01). *Moreover, statistically significant G6PD activity was reported only after three exposures to AW and SS PM<sub>2.5</sub> at their highest concentrations (i.e., 20µg/cm<sup>2</sup>; p<0.01) (Figure 1-B, D, F, and H). There was also no apparent difference between the cytotoxicity reported in NHBE and COPD-DHBE cells after their repeated*

exposure to AW and SS PM<sub>2.5</sub>, even at the highest doses tested. Taken together, these results support the use of 2µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup> as a non-cytotoxic dose and 10µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup> as a low cytotoxic dose for both AW and SS PM<sub>2.5</sub> to apply for the further study of genetic and epigenetic endpoints.

**Figure 1**

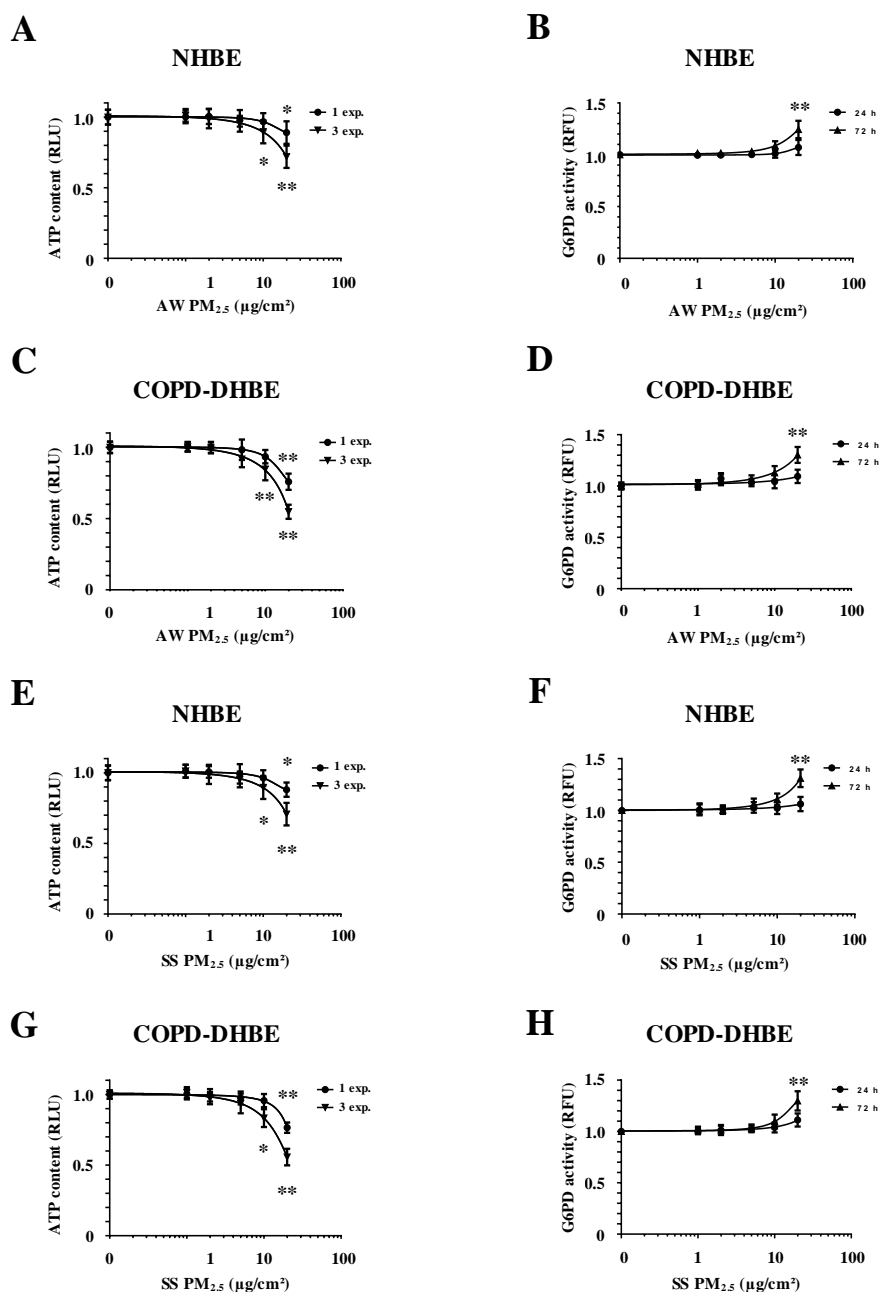


Figure 1: Normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells were grown and thereafter differentiated for 21 days at air-liquid interface. ATP concentration and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) release in cell-free culture media, were measured 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to increasing concentrations (i.e., ranging from 1 to 20µg/cm<sup>2</sup>) of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer

(SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n = 5). (Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE or COPD-DHBE controls: \*: p<0.05; \*\*: p<0.01).

#### **PAH metabolism and DNA adducts in PM<sub>2.5</sub>-exposed NHBE and COPD-DHBE cells**

As shown in Figure 2-A, B, C, and D, there were also concentration-, exposure- and season-dependent increases of the concentrations of PAHs, PAH metabolites, B[a]P, and, in particular, OH-B[a]P metabolites in both NHBE and COPD-DHBE cells (p<0.01). However, PAH and OH-B[a]P metabolite concentrations are less important in COPD-DHBE cells. For example, PAHs concentrations reported in NHBE and COPD-DHBE cells 24h after their exposure to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of AW PM<sub>2.5</sub> were increased by 52.4 and 125-fold in comparison with NHBE cell controls, and by 33.8 and 75.7-fold relative to COPD-DHBE cell controls, respectively. After three exposures to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of AW PM<sub>2.5</sub>, PAHs concentrations were increased by 85.3 and 212.9-fold in contrast with NHBE cell controls, and by 78.4 and 171.9-fold in comparison with COPD-DHBE cell controls, respectively (Figure 2-A). In addition, PAH concentrations reported in NHBE and COPD-DHBE cells 24h after their exposure to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of SS PM<sub>2.5</sub>, were increased by 37.4 and 114.3-fold compared to NHBE cell controls, and by 40.9 and 83.4-fold compared to COPD-DHBE cells, respectively. After three exposures to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of SS PM<sub>2.5</sub>, PAH concentrations were increased by 75.6 and 164.9-fold in comparison with NHBE cells controls, and by 58.7 and 140.1-fold in contrast with COPD-DHBE cell controls, respectively (Figure 2-A). Importantly, major differences were reported for OH-B[a]P metabolite concentrations between healthy and COPD-diseased HBE cells (i.e., from 1.63 to 5.81-fold decreases in COPD-DHBE cells *versus* NHBE cells). In contrast, there were concentration-, exposure- and season-dependent increases of OH-B[a]P DNA adduct concentrations in NHBE, and in particularly, in COPD-DHBE cells (p<0.01) (Figure 2-E). OH-B[a]P DNA adduct concentrations measured in NHBE and COPD-DHBE cells 24h after their exposure to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> AW PM<sub>2.5</sub>, were raised by 1.62 and 4.76-fold compared to NHBE cell controls, and by 4.73 and 6.97-fold compared to COPD-DHBE cell controls, respectively. After three exposures to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of AW PM<sub>2.5</sub>, OH-B[a]P DNA adduct concentrations were increased by 5.51 and 4.28-fold in comparison with NHBE cell controls and by 7.51 and 11.35-fold in contrast with COPD-DHBE control cells, respectively. Moreover, OH-B[a]P DNA adduct concentrations detected 24h after exposure to SS PM<sub>2.5</sub> were raised by 1.61 to 4.41-fold compared to NHBE cells controls, and by 4.76 to 8.25-fold relative to COPD-DHBE cell controls. Hence, B[a]P-coated onto air pollution-derived AW and SS PM<sub>2.5</sub> was metabolized by healthy and COPD-diseased HBE cells and the reactive metabolites generated are able to interact with DNA to form DNA adducts, which can favor the genetic instability. Accordingly, Figure 2-F shows the oxidative DNA adducts produced in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to AW and SS PM<sub>2.5</sub>. It is worth noting that 8-OHdG concentrations were higher in COPD-diseased cells compared to healthy cells (i.e., 1.23-fold increase, p<0.01). In the similar manner as the OH-B[a]P DNA adduct formation, the 8OHdG formation was also concentration-, exposure- and season-dependent in NHBE cells, and, more markedly, in COPD-DHBE cells (p<0.01). Interestingly, NHBE and notably COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air-pollution-derived AW PM<sub>2.5</sub> induced high oxidative DNA adducts, which s weaker in SS PM<sub>2.5</sub> exposed cells.

Figure 2

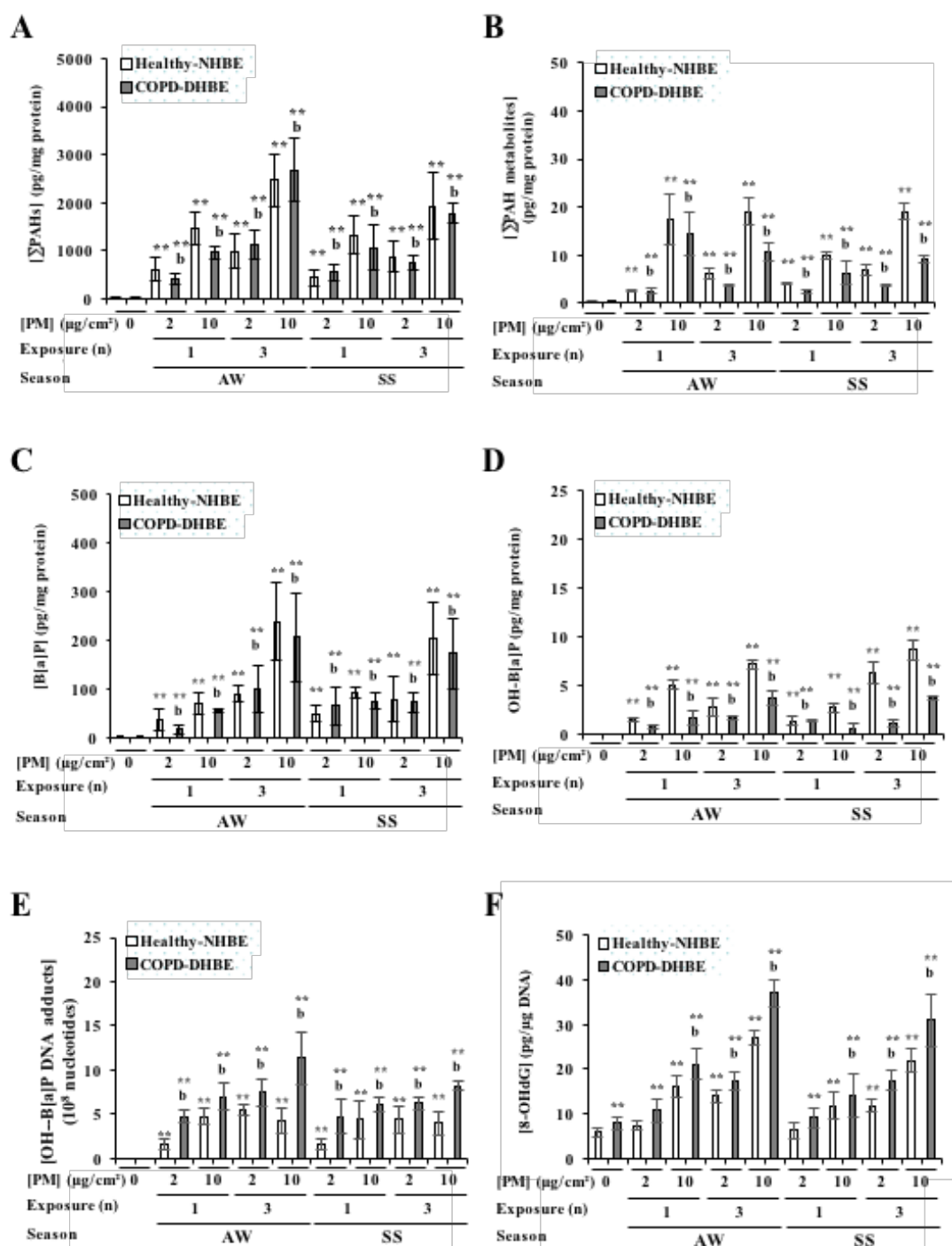


Figure 2: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their metabolites, benzo[a]pyrene (B[a]P) and the DNA adducts formation of its OH metabolites, OH-B[a]P, and the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) formation were determined in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to 2 and 10 μg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer (SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=5). (Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*\*: p<0.01; versus COPD-DHBE controls: b: p<0.01).



### Genetic damages in PM<sub>2.5</sub>-exposed NHBE and COPD-DHBE cells

Primary DNA damage was evaluated by the means of the *in vitro* comet assay under alkaline conditions, MDA4h after the exposure to both the PM<sub>2.5</sub> samples. To exclude cytotoxicity as a confounding factor, the cell viability should be more than 70% for the comet assay. Results of the mean %DNA in the comet tail and the corresponding relative cell viability obtained in NHBE and COPD-DHBE cells are shown in Figure 3-A and C. Healthy and COPD-diseased HBE cells exposed to AW and SS PM<sub>2.5</sub> did not induce any statistically significant cytotoxic effects up to the highest concentration we tested (i.e., 10µg/cm<sup>2</sup>). Moreover, under the experimental conditions above-described, the exposure to AW and SS PM<sub>2.5</sub> did not induce any biologically nor statistically significant increases in DNA strand breaks, whatever the concentration (i.e., 2 and 10µg/cm<sup>2</sup>) or the period of sampling (i.e., SS and AW). Both the PM<sub>2.5</sub> samples were, therefore, considered as non-genotoxic in NHBE and COPD-DHBE cells. In addition, the *in vitro* micronucleus test was used to assess the induction of chromosomal damages (i.e., clastogenicity and/or aneuploidy) 24h after NHBE and COPD-DHBE cells exposure to the two PM<sub>2.5</sub> samples. Results are shown in Figure 3-B and D. In agreement with the last draft of OECD guideline 487 (2014), the genotoxic effects must be associated with low or no cytotoxicity in order to avoid any false positive response. Only concentrations leading to more than 45±5% of cell viability were analyzed. For both the concentrations and the periods of sampling, healthy and COPD-diseased HBE cell exposure to PM<sub>2.5</sub> did not produce any observable chromosomal damage since no biologically nor statistically significant effects were observed. Nevertheless, as shown in Figures 4-A and B, TL and telomerase activity were significantly reduced and increased, respectively, in a concentration- and exposure-dependent manner in NHBE (i.e., from 0.96 to 1.38-fold decreases and from 1.05 to 1.50-fold increases, respectively; p<0.01) and more particularly in COPD-DHBE cells (i.e., from 0.98 to 1.48-fold decreases and 1.07 to 1.57-fold increases, respectively, p<0.01).

Figure 3

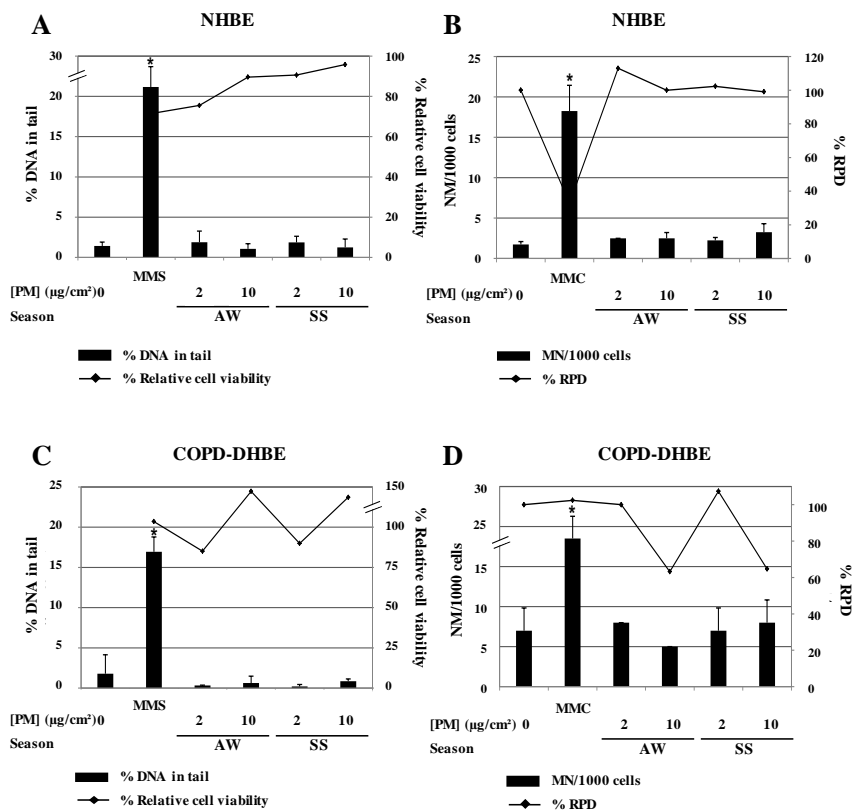


Figure 3: Primary DNA breaks and chromosomal damages were determined in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells immediately or 5 days after 4h exposure to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer (SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=5). (Mann-Whitney U test, CHI-squared test, and ANOVA trend test with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls or COPD-DHBE controls: \*: p<0.05).

Figure 4

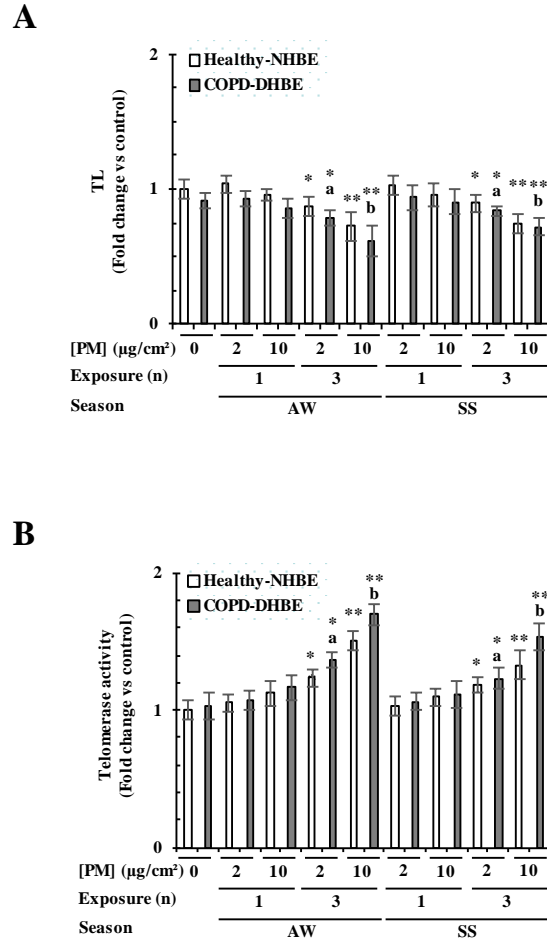


Figure 4: Telomere length (TL) and telomerase activity were evaluated in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to 2 and  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer (SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=5). (Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01; versus COPD-DHBE controls: b: p<0.05 and b: p<0.01).

### **Epigenetic alterations in PM<sub>2.5</sub>-exposed NHBE and COPD-DHBE cells**

As shown in Figure 5-A, B, and C, statistically significant differences were reported for global DNA methylation, P16 gene promoter methylation, and DNMT activity between healthy and COPD-diseased controls ( $p < 0.05$ ). Moreover, there were concentration- and exposure-dependent decreases in the global DNA methylation in NHBE and, more significantly in COPD-DHBE cells ( $p < 0.01$ ). Indeed, the concentrations of 5-mC associated with detectable CpG residues detected in NHBE and COPD-DHBE cells 24h after their exposure to 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  AW PM<sub>2.5</sub>, were decreased by 1.06 and 1.24-fold compared to NHBE cell controls, and by 1.17 and 1.38-fold in comparison with COPD-DHBE cell controls, respectively. After three exposures to 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  AW PM<sub>2.5</sub>, the global DNA methylation went down by 1.16 and 1.79-fold relative to NHBE cell controls, and by 1.28 and 2.23-fold compared to COPD-DHBE cells controls, respectively (Figure 5-A). Moreover, the concentrations of 5-mC associated with detectable CpG residues detected 24h after exposure to SS PM<sub>2.5</sub> were diminished from 1.04 to 1.68-fold in contrast with NHBE cell controls and from 1.12 to 1.81-fold in comparison with COPD-DHBE cell controls. In contrast, there were concentration- and exposure-dependent methylation increases in P16 gene promoter in NHBE and, to a higher extend, in COPD-DHBE cells (i.e., from 0.96 to 2.33-fold increases and from 1.30 to 2.53-fold increases, respectively;  $p < 0.01$ ) (Figure 5-B); however, whatever the exposure conditions, no significant change was reported in the methylation status of the RB1 gene promoter in NHBE and COPD-DHBE cells (data not shown). DNMT activity decreased in a concentration- and exposure-dependent manner in NHBE and in a more considerable manner in COPD-DHBE cells ( $p < 0.01$ ; from 1.06 to 1.52-fold increases and from 1.12 to 1.57-fold increases, respectively;  $p < 0.01$ ) (Figure 5-C). It must be noted that statistically significant decreases in DNMT activity were only observed in healthy and COPD-diseased HBE cells after one or three exposures to the highest concentration we tested (i.e., 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Histone post-translational modifications and related enzyme activities were measured and statistically significant differences were reported for site-specific methylation, acetylation, and phosphorylation of histone H3 (i.e., H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, and H3S10ph), and for HAT and HDAC activities between healthy and in COPD-diseased HBE cell controls ( $p < 0.05$ ; Table 5 and Figures 5-A, B, and C). Moreover, there were concentration- and exposure-dependent changes in these histone post-translational modifications and related enzymes activities in NHBE and more importantly in COPD-DHBE cells ( $p < 0.01$ ). Indeed, H3K4 trimethylation was significantly increased in NHBE (i.e., from 1.40 to 1.57-fold increases) and COPD-DHBE (i.e., from 1.60 to 1.84-fold increases) cells repeatedly exposed to the highest concentration of AW and SS PM<sub>2.5</sub> ( $p < 0.01$ ; Table 5). As shown in Figure 6-A, HDM activity was slightly reduced in healthy and COPD-diseased HBE cells only after their repeated exposure to the highest concentration of the two PM<sub>2.5</sub> samples ( $p < 0.05$ ). Besides, as shown in Table 5, there was a significant acetylation of H3K9 and H3K27 in NHBE (i.e., from 1.34 to 1.91-fold increases, and from 1.30 to 1.85-fold increases, respectively) and COPD-DHBE (i.e., from 1.44 to 2.24-fold increases, and from 1.50 to 1.96-fold increases, respectively) cells repeatedly exposed to the highest concentration of AW and SS PM<sub>2.5</sub> ( $p < 0.01$ ). Accordingly, HAT and HDAC activities were increased and decreased, respectively, in a concentration- and exposure-dependent manner in NHBE (i.e., from 1.04 to 1.36-fold increases and from 1.03 to 1.43-fold increases, respectively;  $p < 0.01$ ) and in particular in COPD-DHBE cells (i.e., from 1.13 to 1.54-fold increases and from 1.09 to 1.57-fold increases, respectively;  $p < 0.01$ ) (Figure 6-B and C). Statistically significant decreases in HAT and HDAC activity were only reported in healthy and COPD-diseased HBE cells after one or three exposures to the highest concentration we tested (i.e., 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Changes in H3S10 phosphorylation were similar as those above-described for H3K4 trimethylation (Table 5).

Figure 5

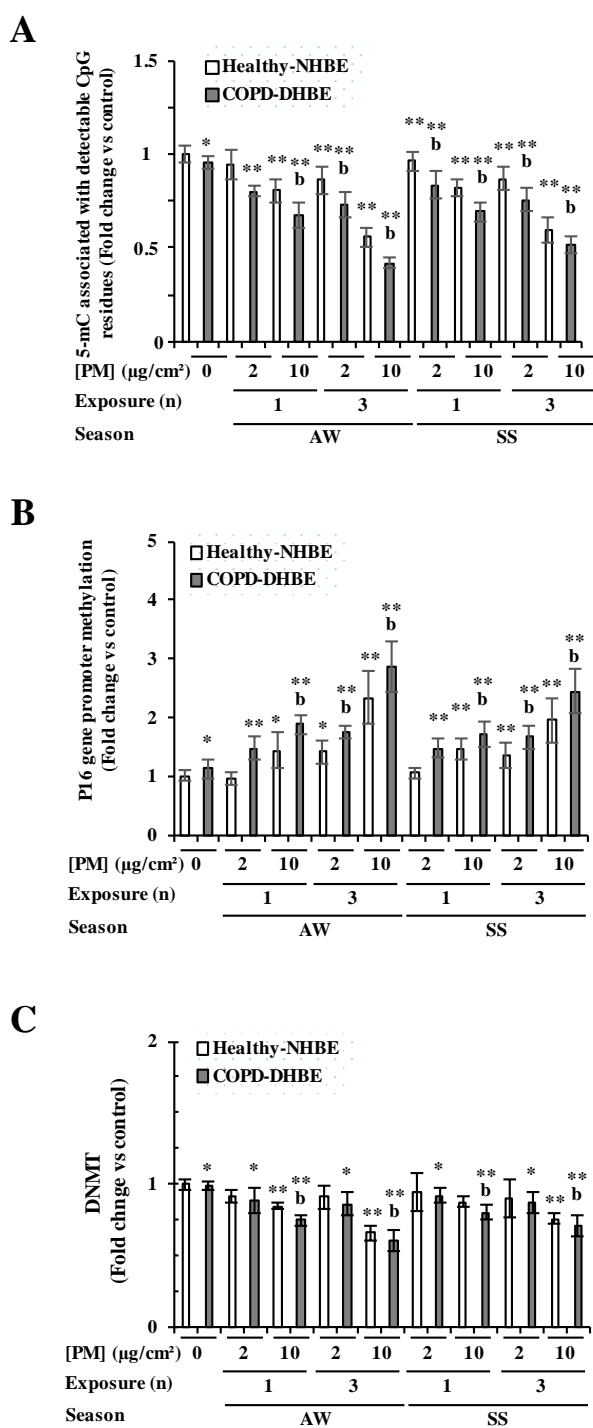


Figure 5: Global DNA methylation, P16 promoter methylation, and DNA methyltransferase (DNMT) activity were evaluated in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer (SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=3 or n=6). (Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01; versus COPD-DHBE controls: b: p<0.01).

Figure 6

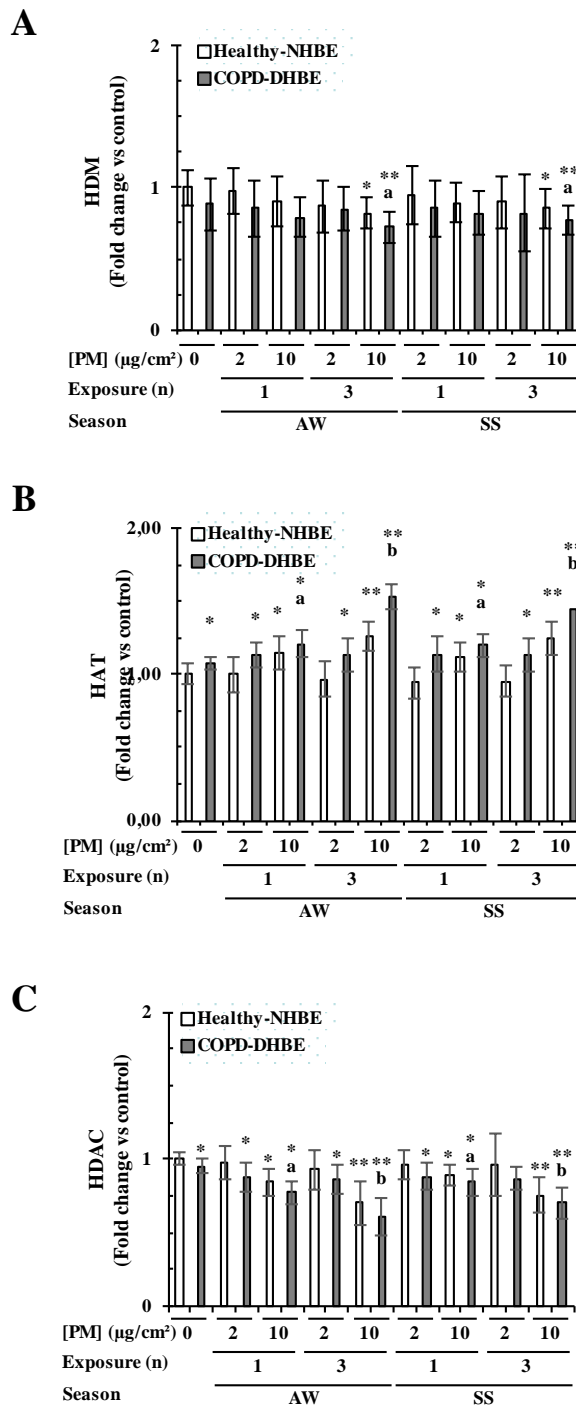


Figure 6: Histone demethylase (HDM), acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) activities were determined in normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during autumn-winter (AW) and spring-summer (SS) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n=3 or n=6). (Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons; versus NHBE controls: \*: p<0.05 and \*\*: p<0.01; versus COPD-DHBE controls: a: p<0.05 and b: p<0.01).

## DISCUSSION

Despite the very high number of *in vitro* approaches reported in respiratory toxicology literature, researchers are still far from having a complete detailed mechanistic explanation of the causal relation between PM and health effects (Longhin et al., 2016). However, the use of more relevant *in vitro* models, such as primary HBE cells, would be appropriate to better address this issue. Moreover, the use of cells isolated from diseased-subjects such as COPD is important to include sensitive diseased phenotypes. Another limitation emerged from *in vitro* submerged exposure systems which does not properly predict the hazard of the tested materials, especially PM, since it has been shown that the exposure route itself may have a crucial impact on the results (Klein et al., 2016). Moreover, the growth of HBE cells at ALI is associated with a reduced biological effect following exposure to PM. This lack of response was not related to differentiation alone but also likely reflected the increased oxygen availability in HBE cells cultured over time at ALI (Ghio et al., 2013). Hence, in this work, in order to get closer to *in vivo* exposure condition, NHBE and sensible COPD-DHBE cell models repeatedly exposed to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> were used to better evaluate the harmful occurrence of genetic and epigenetic alterations.

Air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> samples were collected during two seasons in the center of Lille (France). During these two campaigns, the average PM<sub>2.5</sub> mass concentrations, which were measured at a sampling site nearby (i.e., Lille Fives) by the Atmo NPdC's regional air quality monitoring network, were  $16.8 \pm 10.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and  $16.6 \pm 8.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for the AW and SS seasons, respectively. By comparison, since 2015, the European Directive 2008/50/CE defines a  $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  annual mean of PM<sub>2.5</sub> which must be applied, whereas, the WHO recommended a  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  annual mean of PM<sub>2.5</sub> to preserve human health (EC, 2008; WHO, 2013). The mean PM<sub>2.5</sub> concentrations measured in Lille, reported in this work, were comparable to those found in other European or French urban areas (Cazier et al., 2016; Dergham et al., 2012, 2015; Waked et al., 2014). They had a diameter lesser than  $2.1 \mu\text{m}$ , which was in agreement with the sampling methodology. While the high volume cascade impactor sampler did not collect particles below  $0.39 \mu\text{m}$ , both the PM<sub>2.5</sub> samples also contained a relatively high number of particles below  $0.2 \mu\text{m}$  (i.e., 73.9% with a mean size of 172.3 nm for AW PM<sub>2.5</sub> and 92.7% with a mean size of 184.5nm). No specific PM size repartition can be attributed to a specific sampling season. The metallic element concentrations of the two PM<sub>2.5</sub> samples were comparable to those already reported in the north of France by Mbengue et al. (2014) and Dergham et al. (2012, 2015) in the industrial region of Dunkirk (i.e., ~200,000 inhabitants, and 80km northwest of Lille on the North Sea coast). However, concentrations of Cu, Mo, and Sb in the PM<sub>2.5</sub> samples were significantly higher (i.e., from 30 to 90%) in Lille, while Cr, Mn and Ni, generally associated to industrial activities, were sensibly weaker compared to the industrial site of Dunkirk. Comparing the two distinct sampling seasons, Ba, Ca, Cu, Fe, Mo, Sn, and Th displayed significantly higher concentrations during the AW cold season, while Cd, Cs, Hg, and Tl were higher during the SS warm season. Elements such as As, Bi, Cd, Cr, Cu, Pb, Mo, Sb, Sn, Zn present enrichment factors (i.e., EF, with Al as the reference element) above 10 compared to the average continental crust, certainly linked to typical urban activities (i.e., traffic, residential heating) (McLennan, 2001). Among them, Cu, Sb and Zn are known to be tracers of non-combustion traffic sources (e.g., brake pads and tires wears), while Cd, Pb, As, Mo, and Bi may be associated to coal combustion (Harrison et al., 2012; Pacyna and Pacyna, 2001; Sternbeck et al., 2002; Weckwerth, 2001; Xu et al., 2004). Elements such as Ce, K, Rb, Sc, Si, Th, Ti, and U showed low EF, also close to 1, suggesting mainly their natural origins. The elemental concentrations were higher in the AW PM<sub>2.5</sub> sample than in the SS PM<sub>2.5</sub> (i.e., 207,004 versus 160,246  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Besides, PAH concentrations within the two PM<sub>2.5</sub> samples were much higher than those measured in previous studies from less populated areas of the North region of France. By comparison, PAH concentrations were 3-fold lower in AW season and 35-fold lower in SS season at an urban background site in Douai (i.e., ~40,000 inhabitants, located ~35km south of Lille), and 6 and 5-fold lower for the AW and SS seasons, respectively, at a suburban site in the Dunkirk metropolitan area (Cazier et al., 2016; Dergham et al., 2012, 2015; Crenn et al. 2016). Although the duration of this work in the sampling campaign probably reduced the contrast between the weather conditions, and the atmospheric dispersion was probably enhanced for the coastal site of Dunkirk, only a high contribution of combustion particles from vehicle exhaust and unburned fuel can explain the relatively high levels of PAHs we observed and the reduced seasonal trend in Lille. Nevertheless, PAHs concentrations were higher in the AW PM<sub>2.5</sub> sample compared to the SS PM<sub>2.5</sub> (i.e., 69.4 versus 25.4  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). AW-to-SS ratios were also in the range 2 to 4 for all PAHs except for anthanthrene (ANT), which reached 23 due to a very low SS season concentration. It can also be noted that benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[g,h,i]perylene (BghiP), and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (IP) were the most abundant PAHs for both seasons, accounting for 35-40% of all the PAHs we measured. The concentrations of PCDD/Fs, and DL- and M-PCBs were higher in the AW PM<sub>2.5</sub> than in the SS PM<sub>2.5</sub> (i.e.,  $\sum\text{PCDDs}$ : 13.9 versus 11.5  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,  $\sum\text{PCDFs}$ : 6.37 versus 4.45  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,  $\sum\text{DL-PCBs}$ : 44.5 versus 24.3  $\mu\text{g}/\text{g}$ , and  $\sum\text{M-PCBs}$ : 233 versus 158  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). PCDD/Fs levels detected in the two PM<sub>2.5</sub> samples were in similar ranges of value as

those already described in the region, whereas the levels of DL- and M-PCBs were less important (Dergham et al., 2012, 2015). Hence, the AW and SS PM<sub>2.5</sub> samples we collected in Lille showed several chemical differences.

The cell culture conditions we used in this work ensure that HBE cells exhibit a differentiation phenotype, showing similarity points with *in vivo* HBE (Bérubé et al., 2010; Boublil et al., 2013; Pezzulo et al., 2011). Indeed, the immunofluorescence labelling of specific markers (e.g., pan-cytokeratin, MUC5AC) reported by Leclercq et al. (2016) supported that NHBE and COPD-DHBE cells and their cell culture conditions allowed us to get as close as possible to *in vivo* conditions found in HBE. To date, only few studies used HBE cells to evaluate air pollution-derived PM toxicity and among them, even less differentiate HBE cells at ALI conditions (Boublil et al., 2013). In this work, the reported cytotoxicity suggested the use of 2µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup> as a non-cytotoxic dose and 10µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup> as a low cytotoxic dose of AW and SS PM<sub>2.5</sub> to apply for genetic and epigenetic endpoints study. These doses were in agreement with those previously used by other authors, who developed HBE cells differentiated at ALI model, and these doses were among the lowest reported in the literature to give significantly harmful effects (Boublil et al., 2013; Leclercq et al., 2016; Longhin et al., 2013). It is also of great importance to diminish as much as possible the doses to be able to study the underlying mechanisms while staying as close as possible to realistic exposure levels.

As shown by their above-described physicochemical characteristics, the two PM<sub>2.5</sub> samples we collected contained a wide variety of organic chemicals including PAHs, which could, directly or indirectly, through their metabolic activation, participate to the PM<sub>2.5</sub> toxicity in HBE cells (Boublil et al., 2013; Dergham et al., 2012, 2015; Longhin et al., 2013, 2016; Leclercq et al., 2016; Zhou et al., 2015). We also observed concentration-, exposure- and season-dependent increases of the concentrations of PAHs, PAH metabolites, B[a]P, and, in particular, OH-B[a]P metabolites in NHBE cells, and to a lesser extent in COPD-DHBE cells. These results were in strong agreement with the contrasted concentrations of B[a]P detected in AW and SS PM<sub>2.5</sub> samples (i.e., 6.86 and 1.86µg/g, respectively). Other authors have already provided evidence of PAH bioavailability and metabolic activation in PM-exposed HBE cells (Boublil et al., 2013). Interestingly, in repeatedly exposed COPD-DHBE cells, despite the lower gene expression of PAH-related xenobiotic metabolizing enzymes reported by Leclercq et al. (2016), there was a more pronounced OH-B[a]P DNA adduct formation. This apparent discrepancy could be partially explained by the COPD etiology, which is generally associated with a long-term smoking and a subsequent exposure of the respiratory tract to inhaled toxicants, making DNA damages hard to be repaired (Pauk et al., 2013). In this work, COPD-diseased cells donors had all smoking habits. COPD-diseased HBE cells seemed to have a moderate capacity to convert PAHs into metabolites, such as OH-B[a]P, but they appeared to be more sensible to the formation and/or the sustainability of OH-B[a]P adducts than healthy HBE cells, probably because their diseased state could affect their defense capacities (Rode et al., 2016). Furthermore, 8-OHdG levels increased in a concentration-, exposure- and season-dependent manner in NHBE cells, and, in particular, in COPD-DHBE cells. In addition to the metal-catalyzed ROS generation, the above-suggested metabolic activation of PAHs in healthy and diseased HBE cells would contribute to ROS generation (Ghio et al., 2012). Longhin et al. (2013) also reported that PM with higher PAH quantities induced an important oxidative stress. Accordingly, the AW PM<sub>2.5</sub> sample, and, to a lesser extent, the SS PM<sub>2.5</sub> sample, contained metals (e.g., Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, and Zn) and organic species (e.g. PAHs, PCDF/Ds) generally associated with redox reactions. The occurrence of oxidative stress conditions induced high oxidative damages on macromolecules such as DNA (i.e., 8-OHdG), which can dramatically deregulate the cell homeostasis (Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Gualtieri et al., 2010, 2011; Leclercq et al., 2016). COPD disease is generally associated with a rising oxidative stress, rendering the cells we used more sensible to the other harmful effects of air-pollution derived pollutants. Indeed, both OH-B[a]P and 8-OHdG DNA adducts caused by repeated PM<sub>2.5</sub> exposures were more marked in COPD-DHBE cells *versus* NHBE cells, thereby confirming their higher sensitivity to external injuries and their genetic instability (Caramori et al., 2011).

However, despite the occurrence of alkyl and oxidative DNA adducts in healthy and particularly in diseased HBE cells repeatedly exposed, no biologically nor statistically significant increases in primary DNA strand breaks and no observable chromosomal aberrations, were reported whatever the concentration (i.e., 2 and 10µg/cm<sup>2</sup>) or the sampling period (i.e., SS and AW). Air pollution-derived PM from anthropogenic or combustion-related sources has been tested for mutagenicity in various systems and experimental settings for many decades. There is now overwhelming evidence that ambient air contains hundreds of genotoxic compounds (IARC, 2013). However, in almost all of these studies, mutagenic and/or genotoxic potential was determined from extracted organic matter (EOM), prepared from PM sampled in industrialized and/or urbanized areas worldwide. In this context, most of these studies reported that, in the EOM, some chemicals are mutagenic and/or genotoxic. However, as reported by André et al (2011), extrapolations to potential effects on human health are limited for many reasons, including the too important chemical concentrations in EOM, the bioavailability differences between EOM and the whole complex mixture-coated onto PM, and the interactions between surface and core chemicals. To date, only a few works test directly the air pollution-derived PM genotoxicity. Among them, Lepers et al. (2014), using BEAS-2B

cell line once exposed to several native PM<sub>2.5</sub> samples collected in Dunkirk City's region. They tried to demonstrate PM<sub>2.5</sub> genotoxicity and clastogenicity by evaluating global DNA damages using alkaline comet assay and potential consequences of previously induced lesions through micronuclei counting. Despite the lack of a clear concentration- and season-dependent effects in their results, they supported that PM<sub>2.5</sub> samples collected during the AW season would have higher a genotoxic potency than those collected in the SS one. Surprisingly, they reported significant increases in the median percentage of DNA in comet tail and in the number of micronuclei per 1000 mononuclear cells after BEAS-2B cells exposure to the six PM<sub>2.5</sub> samples at 15 and even 3.75 μg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup>. The apparent discrepancy between the results we reported and the above-described results might notably rely on the use of ALI *versus* submerged exposed cells, on the one hand, and the use of primary cultures *versus* transformed cells, on the other hand. This statement reinforced the importance of using innovative *in vitro* exposure systems such as NHBE and COPD-DHBE cells in ALI which better reflect the real exposition conditions. In addition, in this work, TL and telomerase activity were significantly reduced and increased, respectively, in a concentration- and exposure-dependent manner in NHBE and in particular in COPD-DHBE cells. Telomeres are structure regions of non-coding DNA at the end of chromosomes and they protect chromosome's ends against structural degradations, inappropriate recombinations and end-to-end fusions (Hewitt et al., 2012). Telomere shortening has been shown to contribute to a persistent DNA damage response during replicative senescence, and the irreversible loss of division potential of somatic cells. Telomeres shorten with each successive cell division, and, thus, reflect the biological aging. Shortened telomeres are related to an increasing risk of chronic diseases (DeMarini, 2013). In addition, telomere shortening is frequently associated with decreased lung functions and with a rising risk of developing COPD pathology or cancers. Moreover, telomerase activity is regularly raised in COPD patients and in lung cancer patients (Fernandez-Marcelo et al., 2015; Bozkus et al., 2016; Rodes et al., 2016). Other studies indicated that oxidative stress and chronic inflammation, which can also be mediated by environmental and occupational exposures are considered to be major mechanisms that influence TL and telomerase activity (Zhang et al., 2013). Accordingly, among the 14 studies reviewed by Zhang et al. (2013), 11 have reported that TL shortening is associated with environmental exposures, including traffic-related air pollution (e.g., PM, black carbon, PAHs). All these studies suggested that these environmental chemical exposures may accelerate telomere shortening, which may be a possible biological mechanism leading to diseases such as COPD or cancer. Despite the lack of primary DNA strand breaks and observable chromosomal cleavages, the OH-B[a]P DNA adducts and 8-OHdG occurred in NHBE and particularly in COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. These results together with the telomere shortening and the telomerase activity reduction, supported the genotoxicity of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>.

In addition to DNA damages which induce genetic abnormalities, air pollution-derived PM is now well-recognized to alter the epigenome, leading to dramatically dysregulation of genes expression (Li et al., 2015). Indeed, PM exposure can cause epigenetic changes in all the three classes: DNA methylation, histone post-translational modifications, and miRNAs. Together, these processes affect the genes expression pattern, influence DNA accessibility and chromatin compaction, regulate the integrity and function of the genome, and maintain the nuclear organization in a manner that determines the healthy or diseased cells state. Therefore, a better knowledge of the epigenetic changes induced by PM exposure may provide an important tool for analyzing the association between PM exposure and chronic inflammatory lung diseases. In this work, there were a global DNA hypomethylation, a *P16* gene promoter hypermethylation, and a decreasing DNMT activity in COPD-DHBE cell controls compared to NHBE cell controls. Indeed, there is a strong evidence between DNA methylation modifications and the presence and severity of COPD (Zong et al., 2015). Wang et al. (2012) demonstrated that changes in genome-wide methylation can be found in COPD, and dynamic, site-specific methylations changes appear in response to smoking and may contribute to the extended risks associated with cigarette smoking that persist after cessation. Moreover, Liu et al. (2010) reported that the progressive genomic hypomethylation and locoregional DNA hypermethylation induced in NHBE cells exposed to cigarette smoke (CS) coincided with an important clonogenicity increase which confirm the cellular anchorage-independent growth. Collectively, their data indicated that CS induces 'cancer-associated' epigenomic alterations in NHBE cells. Many single gene and genome wide studies provided evidence that changes in DNA methylation are associated with cigarette smoke, and may be the cause of smoking associated illness, such as COPD (Zong et al., 2015). Accordingly, Clifford et al. (2016) indicated that diesel exhaust exposures led to differential methylation of CpG sites from genes involved in transcription factor activity, protein metabolism, cell adhesion, and vascular development, among others. Moreover, acute exposure to air pollution-derived PM resulted in *P16* gene promoter hypermethylation, which can favor the genomic instability and the cell cycle progression (Baccarelli et al., 2009; Soberanes et al., 2012; Tarantini et al., 2009). Indeed, hypermethylation of gene promoter CpG island(s) is commonly associated with the suppression of gene expression (Ibuki et al 2014). The methylated promoter region diminished the affinity for transcription factors and increased the affinity for methylated DNA-binding proteins, HAT, HMT, and/or corepressors. The methylation state is actively maintained by DNMTs activities, including DNMT1, which



facilitates the replication of the DNA methylation pattern over successive cell generations, while, DNMT3a and DNMT3b mediate de novo methylation (Li et al., 2015). In this work, we demonstrated that the repeated exposure of NHBE and notably COPD-DHBE cells to both the PM<sub>2.5</sub> samples provided decreases in the global DNA methylation, a P16 promoter hypermethylation and a DNMT activity decrease. Indeed, in their review, Wang et al. (2012) indicated that, DNA methylation and PM exposure can be associated with ROS generation by transitional metals or other chemical PM-contents. Indeed, oxidative DNA damages can interfere with the ability of DNMT to interact with DNA, thus resulting in an altered methylation at CpG sites. Acute exposure (i.e., 1-7 days) to air pollution-derived PM leads to a consistently global DNA methylation reduction, both in human and in experimental animal studies, whereas chronic exposure may mediate complex and conflicted outcomes, possibly due to PM type variations. Hence, as above-described in this work PM-induced oxidative stress may exert direct or indirect influences on the DNA methylation modifications we measured. Moreover, several studies have shown that epigenetic events, such as histone acetylation/deacetylation or methylation/demethylation, contributed to air pollutant induced lung inflammatory responses used *in vitro* and *in vivo* models. Nevertheless, the exact role of histone modifications in chromatin remodeling of chronic lung diseases remains unclear (Sundar et al., 2013). Histone modifications, including acetylation, methylation, and phosphorylation can regulate gene transcription levels (Li et al., 2015). With regards to histone H3 modifications, differences in H3K4 methylation, in H3K9 and H3K27 acetylation, and in H3S10 phosphorylation were reported in COPD-DHBE controls compared to NHBE controls. In agreement with these results, Vucic et al., (2014) indicated that histone methylation, notably in H3K4, and H3K27 hyperacetylation are important mechanisms involved in COPD biology. In addition, Sundar et al. (2013) found that CS-induced distinct posttranslational histone modification patterns in histone H3 (e.g., H3K4me3 and H3K27ac) in human lung epithelial H292 cells. Indeed, H3K4 methylation is rather linked to gene activation. The levels and activities of HDAC, particularly HDAC2, are significantly reduced in smokers with COPD (Kabesch and Adcock, 2012; Li et al., 2015; Zhong et al 2015). Ito et al. (2016) reported that total HDAC activity is decreased in peripheral lung tissue samples, in alveolar macrophages, and in bronchial-biopsy from patients with COPD and this decrease is correlated with disease severity and the intensity of the inflammatory response. Acetylation of lysine residues on H3 has been suggested to have a direct relationship with the transcription of genes that promote inflammation (Chen et al., 2015). Moreover, there were concentration- and exposure-dependent changes in site-specific methylation, acetylation, and phosphorylation of histone H3 (i.e., H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, and H3S10ph), on the one hand, and HDM, HAT and HDAC activities, on the other hand, in healthy and in COPD-diseased cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. Ibuki et al. (2014) reported that CS exposure phosphorylated H3S10 via JNK and PI3K/Akt pathways, resulting in tumor promotion. Moreover, Cantone et al. (2014) indicated that metal rich air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> modify the levels of specific extracellular histone modifications, notably H3K4 trimethylation and H3K9 acetylation. Indeed, HATs and HDACs work together to balance histone acetylation. Histones acetylation reduces the histone affinity for DNA resulting in DNA unpacking which favor the accessibility for RNA polymerase II and transcription factors and the transcriptional activation (Li et al., 2016). Evidences suggest that the modulated activities of HDM, HAT, and HDAC may contribute to the epigenetic changes induced by PM or PM-related chemicals but the underlying mechanisms are not completely clear (Li et al., 2015). For example, Wang et al. (2012) reported that air pollution-derived PM contributed to dysregulated histone acetylation. Indeed, Ni and Cr reduce histone H3 acetylation, whereas PAHs promote histone H3 acetylation via the aryl hydrocarbon receptor activation. In this study, we showed concentration- and exposure-dependent changes in site-specific methylation, acetylation, and phosphorylation of histone H3 (i.e., H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, and H3S10ph), on the one hand, and HDM, HAT and HDAC activities, on the other hand, in healthy and in COPD-diseased cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. Hence, these results showed the emergence of epigenetic changes in DNA methylation and histone post-translational modification, in NHBE cells and notably in COPD-DHBE cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. These results also supported the higher sensitivity of the diseased cell model, thereby underlining the real need to use sensible diseased models to better consider the sensitive individuals in terms of epigenetic regulation.

To conclude, with the aim of being closer to environmental human exposure levels, we have developed a relevant experimental strategy allowing us to repeatedly expose NHBE and COPD-DHBE cells cultured in ALI to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. By studying genetic and epigenetic endpoints in these healthy and diseased HBE cell models repeatedly exposed to PM<sub>2.5</sub>, we not only highlighted the key role played by all these mechanisms but also the difference in their responsiveness to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>. Indeed, COPD-DHBE cells were more sensitive to pollution-derived PM<sub>2.5</sub> and showed an exacerbation of some of the underlying mechanisms normally induced. Moreover, our work allowed us to identify some epigenetic modifications involved in lung diseases linked to environmental exposures such as PM. These modifications could be used as biomarkers for the early detection of COPD or lung cancers. However, next investigations are needed to confirm these targets and to identify new ones which can reflect the whole past exposures and predict the future diseases risks.

## FUNDING SOURCES

This work benefited from grants from the ITMO Cancer (i.e., Plan Cancer 2009-2013, Contract n°ENV201210), the University of Lille, and the Mines de Douai. BL's PhD is supported by the Région Nord-Pas de Calais and the Mines de Douai (Contract n°13005131). The authors sincerely thank Dr A. HACHIMI and Dr P-E. LAFARGUE, from MicroPolluants Technologie S.A. (Saint Julien Les Metz, France), for their highly skillful assistance in the analyses of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and furans, and dioxin-like and marker polychlorinated biphenyls.

## CONFLICT OF INTEREST

All authors of this manuscript do not have any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

## REFERENCES

- Alleman, L.Y., Lamaison, L., Perdrix, E., Robache, A., Galloo, J.-C. 2010. PM<sub>10</sub> metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone. *Atmospheric Research*, 96, 612-625.
- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2009. Air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an *in vitro* coculture lung model *Toxicol In vitro* 2, 37-46.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2010. Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after *in vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub> *Chem Biol Interact* 188, 558-565.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., André, V., Gosset, P., Billet, S., Le Goff, J., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., Shirali, P., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model *J Appl Toxicol* 33, 109-119.
- Abbas, I., Verdin, A., Escande, F., Saint-Georges, F., Cazier, F., Mulliez, P., Courcot, D., Shirali, P., Gosset, P., Garçon, G., 2016. *In vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5-0.3</sub> induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Env Res* 147, 146-158.
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Le Goff, J., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., Sichel, F., 2010. Mutagenicity and genotoxicity of PM<sub>2.5</sub> issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France) *J Appl Toxicol* 31, 131-138.
- Baccarelli, A., Vollati, B., 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 21, 243-251.
- Beelen, R., Raaschou-Nielsen, O., Stafoggia, M., 2013. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *The Lancet* 383, 785-795.
- Bérubé, K.A., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): 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., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* 270, 144-155.
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium *in vitro* to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in vitro* 27, 533-542.
- Bozkus, F., Guler, S., Simsek, S., 2016. Serum telomerase levels and COPD exacerbations. *Respir Care* 61(3), 359-365.
- Brody, H., 2014. Lung cancer. *Nature* 513, S1
- Cassee, F.R., Heroux, M.-E., Gerlofs-Nijland, M.E., Kelly, F.J., 2013. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhal. Toxicol.* 25, 802-812.

- Caramori, G., Adcock, I.M., Casolari, P., Ito, K., Jazrawi, E., Tsaprouni, L., Villetti, G., Civelli, M., Carnini, C., Chung, K.F., Barnes, P.J., Papi, A., 2011. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax* 66, 521-527.
- Cawthon, R.M., 2009. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 37 (3), e21.
- Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Nouali, H., Verdin, A., Ledoux, F., Hachimi, A., Courcot, L., Billet, S., Bouhsina, S., Shirali, P., Garçon, G., Courcot, D. 2016. Characterisation and seasonal variations of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas: Organic compounds. *J Env. Sci.* 44, 45-56.
- Chen, X., Guan, X.J., Luan, C.Y., Guo, X.J. (2015). Acetylation of lysine 9 on histone H3 is associated with increased pro-inflammatory cytokine release in a cigarette smoke-induced rat model through HDAC1 depression *Inflamm. Res.* (2015) 64:513–526
- Clifford, R.L., Jones, M.J., MacIsaac, J.L., McEwen, L.M., Goodman, S.J., Mostafavi, S., Kobor, M.S., Carlsten, C., 2016. Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation. *J Allergy Clin Immunol.* S0091-6749(16), 30273-30281.
- Crenn et al. (2016) (in press) - <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969715311463>
- Christensen, B.C., Marsit, C.J. (2011). Epigenomics in environmental health. *Frontiers in Genetics* 2(84), 1-10
- Dagher, Z., Garçon, G., Gosset, P., Ledoux, F., Surpateanu, G., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2005. Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 25, 166-175.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Activation of different pathways of apoptosis by Dunkerque city air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* 225, 12-24.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2007. Role of Nuclear Factor-kappa B Activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 27, 284-290.
- DeMarini, D.M. 2013. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis.* 28(5):485-505.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) produced in rural-, urban-, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem Res Toxicol* 25, 904-919.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Env Res* 137, 256-267.
- Esteller, M. 2011. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports* 3(9), 1-6.
- European Parliament and the Council of the European Union, 2008. Air Quality -Existing Legislation. Directive 2008/50/EC of the European parliament and of the council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008L0050:EN:NOT>> retrieved 01.10.2016)
- Fenech, M. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534, 65-75.
- Fenech, M., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmüller, S., Holland, N. 2007. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells-a Human Micronucleus (HUMN) project ([www.humn.org](http://www.humn.org)) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis.* 22, 3-4.
- Fernández-Marcelo, T. 2015. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *J Exp Clin Cancer Res.* 34(1), 78.
- Freishtat, R.J., Watson, A.M., Benton, A.S., Iqbal, S.F., Pillai, D.K., Rose, M.C., Hoffman, E.P., 2011. Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dyssynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 863-869.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol in vitro* 20, 519-528.
- Ghio, A.J., Dailey, L.A., Soukup, J.M., Stonehuerner, J., Richards, J.H., Devlin, R.B., 2013. Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part Fibre Toxicol* 10, 25.

- Grahame, T.J., Schlesinger, R.B. 2012. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Particle and Fibre Toxicology* 9(21), 1-19.
- Grova, N., Salqu ebre, G., Schroeder, H., Appenzeller, B.M., 2011. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.*, 2011. 24(10), 1653-1667.
- Grova, N., Salqu ebre, G., Hardy, E.M., Schroeder, H., Appenzeller, B.M., 2014. Tetrahydroxylated-benzo[a]pyrene isomer analysis after hydrolysis of DNA-adducts isolated from rat and human white blood cells. *J Chromatogr A* 1364, 183-191.
- Grova, N., Hardy, E.M., Meyer, P., Appenzeller, B.M., 2016. Analysis of tetrahydroxylated benzo[a]pyrene isomers in hair as biomarkers of exposure to benzo[a]pyrene. *Anal Bioanal Chem* 408(8), 1997-2008.
- Gualtieri, M.,  vrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E., Camatini, M, 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol in vitro* 24, 29-39.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.J., Camatini, M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat Res* 713, 18-31.
- Genies, C., Ma tre, A., Lefebvre, E., Jullien, A., Chopard-Lallier, M., Douki, T. 2013. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PLOS ONE*, 8(11), e78356
- Guil, S., Esteller, M., 2009. DNA methylomes: histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 87-95.
- Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D, 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 122, 906-911.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(4), 648-674.
- Harrison, R. M., Jones A. M., Gietl J., Yin J., Green D. C. 2012. Estimation of the contributions of brake dust, tire wear, and resuspension to nonexhaust traffic particles derived from atmospheric measurements. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6523–6529.
- Herceg, Z., Vaissiere, T. 2011. Epigenetic mechanisms and cancer. An interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 6(7), 804-819.
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J, Passos, J.F. 2012.
- Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun.* 28(3):708.
- Ho, S.M., Johnson, A., Tarapore, P., Janakiram, V., Zhang, X., Leung, Y.K., 2012. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. *ILAR Journal* 53(4), 289-306.
- Ibuki, Y., Toyooka, T., Zhao, X., Yoshida, I. 2014. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis* 35(6), 1228-1237.
- Ji, H., Khurana Hershey, G.K, 2012. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 129(1), 33-42.
- Jerrett, M., Turner, M.C., Beckerman, B.S., Pope III, C.A., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Serre, M., Crouse, D., Gapstur, S.M., Krewski, D., Diver, W.R., Coogan, P.F., Thurston, G.D., Burnett, R.T. Comparing the health effects of ambient particulate matter estimated using ground-based versus remote sensing exposure estimates. *Environ Health Perspect* DOI: 10.1289/EHP575.
- Kabesch, M., Adcock, I.M. 2012. Epigenetics in asthma and COPD. *Biochimie* 94, 2231-2241.
- Kesimer, M., Kirkham, S., Pickles, R.J., Henderson, A.G., Alexis, N.E., Demaria, G., Knight, D., Thornton, D.J., Sheehan, J.K., 2009. Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L92-L100.
- Klein, S.G., Serchi, T., Hoffmann, L., Bl meke, B., Gutleb, A.C., 2013. An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol.* 26(10), 31. doi: 10.1186/1743-8977-10-31.
- Kordinas, V., Ioannidis, A., Chatzipanagiotou, S. 2016. The telomere/telomerase system in chronic inflammatory diseases. cause or effect? *Genes* 3(7), 9.

- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E.M., Alleman, L.Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B.M., Lo Guidice, J-M., Coddeville, P., Garçon, G., 2016. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Env. Poll.* 218, 1074-1088.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F., 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicol in Vitro* 28, 866-874.
- Li, J., Li, W.X., Bai, C., Song, Y., 2015. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *The Clinical Respiratory Journal* - ISSN 1752-6981 John Wiley & Sons Ltd.
- Liu, F., Killian, J.K., Yang, M., Walker, R.L., Hong, J.A., Zhang, M., Davis, S., Zhang, Y., Hussain, M., Xi, S., Rao, M., Meltzer, P.A., Schrupp, D.S., 2010. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene* 29, 3650-3664.
- Loxham, M., Morgan-Walsh, R.J., Cooper, M.J., Blume, C., Swindle, E.J., Dennison, P.W., Howarth, P.H., Cassee, F.R., Teagle, D.A.H., Palmer, M.R., Davies, D.E., 2015. The effects on bronchial epithelial mucociliary cultures of coarse, fine, and ultrafine particulate matter from an underground railway station. *Toxicological Sciences*, 145(1), 98-107.
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol in vitro* 27, 551-559.
- Longhin, E., Capasso, L., Battaglia, C., Proverbio, M.C., Consentino, C., Cifola, I., Mangano, E., Camatini, M., Gualtieri, M., 2016. Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ Poll* 209, 87-98.
- Lonkar, P., Dedon, P.C., 2011. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation, reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer* 128(9), 1999-2009.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC., Lyon., France, 2013. *Lancet Oncol* 14, 1262-1263.
- Mbengue, S., Alleman L.Y., Flament, P., 2014. Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmospheric Research*, 135-136, 35-47.
- McLennan, S. M., 2001. Relationships between the trace element composition of sedimentary rocks and upper continental crust. *Geochem. Geophys. Geosy.* 2 (4), 1021.
- Miller, B.M., Pujadas, E., Gocke, E., 1995. Evaluation of the micronucleus test in vitro using Chinese hamster cells: results of four chemicals weakly positive in the in vivo micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 26, 240-247.
- OECD. 2014. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- Pauk, N., Klimesova, S., Kara, J., Topinka, J., Labaj, J., 2013. The relevance of monitoring of antibodies against the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and PAH-DNA adducts in serum in relation to lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma* 60(2), 182-187.
- Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., McCray, Jr P.B., Zabner J., 2011. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L25-L31.
- Pillai, D.K., Sankoorikal., B.J.V., Johnson, E., Seneviratne, A.N., Zurko, J., Brown, K.J., Hathout, Y., Rose, M.C., 2014. Directional secretomes reflect polarity-specific functions in an in vitro model of human bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50(2), 292-300.
- Pope, C.A. 3rd, 2014. Particulate air pollution and lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 190, 485-486.
- Raaschou-Nielsen, O., Beelen, R., Wang, M., Hoek, G., Andersen, Z.J., Hoffmann, B., Stafoggia, M., Samoli, E., Weinmayr, G., Dimakopoulou, K., Nieuwenhuijsen, M., Xun, W.W., Fischer, P., Eriksen, K.T., Sørensen, M., Tjønneland, A., Ricceri, F., de Hoogh, K., Key, T., Eeftens, M., Peeters, P.H., Bueno-de-Mesquita, H.B., Meliefste, K., Oftedal, B., Schwarze, P.E., Nafstad, P., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Penell, J., De Faire, U., Korek, M., Pedersen, N., Östenson, C.G., Pershagen, G., Fratiglioni, L., Concin, H., Nagel, G., Jaensch, A., Ineichen, A., Naccarati, A., Katsoulis, M., Trichpoulou, A., Keuken, M., Jedynska, A., Kooter, I.M., Kukkonen, J., Brunekreef, B., Sokhi, R.S., Katsouyanni, K., Vineis, P., 2016. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ Int.* 87, 66-73.
- Rode, L., Bojesen, S.E., Weischer, M., Vestbo, J., Nordestgaard, B.G., 2013. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46 396 individuals. *Thorax* 68, 429-435.

- Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter, PM<sub>2.5</sub>. *Toxicology* 244, 220-230.
- Saint-Georges, F., Garçon, G., Escande, F., Abbas, I., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2009. Role of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in the occurrence of loss of heterozygosity in multiple critical regions of 3p chromosome in human epithelial lung cells, L132. *Toxicol Lett* 187, 172-179.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- 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., Mutlu, G.M., De Vizcaya-Ruiz, A., Budinger, G.R., 2012. Particulate matter air pollution induces hypermethylation of the P16 promoter via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Sci Rep* 2, 275-285.
- Sternbeck, J., Sjodin, A., & Andreasson, K. 2002. Metal emissions from road traffic and the influence of resuspension- results from two tunnel studies. *Atmospheric Environment*, 36, 4735–4744.
- Sundar, I.K., Nevid, M.Z., Friedman, A.E., Rahman, I, 2010. Cigarette smoke induces distinct histone modifications in lung cells: implications for the pathogenesis of COPD and lung cancer. *J Proteome Res* 13, 982-996.
- Tarantini, L., Bonzini, M., Apostoli, P., Pegoraro, V., Bollati, V., Marinelli, B., Cantone, L., Rizzo, G., Hou, L., Schwartz, J., Bertazzi, P.A., Baccarelli, A., 2009. Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect* 117(2) 217-222.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J-C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Wang, T., Garcia, J.G.N., Zhang, W. (2012). Epigenetic regulation in particulate matter-mediated cardiopulmonary toxicities: a systems biology perspective. *Curr Pharmacogenomics Person Med.* 10(4), 314–321.
- Weckwerth, G. 2001. Verification of traffic emitted aerosol components in the ambient air of Cologne (Germany). *Atmospheric Environment*, 35, 5525–5536.
- World Health Organization, 2014. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. Available at [www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/) viewed May 30, 2016.
- Zhang, J., Ghio, A.J., Gao, M., Wei, K., Rosen, G.D., Upadhyay, D., 2007. Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest, role of G1 cyclins. *FEBS Lett* 581, 5315-5320.
- Zhou, B., Liang, G., Qin, H., Peng, X., Huang, J., Li, Q., Qing, L., Zhang, L., Chen, L., Ye, L., Niu, P., Zou, Y., 2014. P53-dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE cells) by PM<sub>2.5</sub> sampled from air in Guangzhou., China. *Toxicol Mech Methods* 24, 552-559.
- Zong, D.D., Ouyang, R.J., Chen P. 2015. Epigenetic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19, 844-856.

**Table 1: Characteristics of the healthy and COPD-subjects and isolated HBE cells**

Variable <sup>a</sup>	Healthy subjects	COPD subjects
Number (n)	5	5
Age (years) <sup>m</sup>	49.8 ± 11.8	54.8 ± 10.2
Sex <sup>m</sup>	3 males / 2 females	2 males / 3 females
Race <sup>k</sup>	5 Caucasians	5 Caucasians
Smoking habits <sup>k</sup>	5 non-smokers	5 smokers <sup>**</sup>
Alcohol use <sup>k</sup>	5 non-alcohol users	5 non-alcohol users
HBE cell passage <sup>k</sup>	1	1
HBE cell viability (%) <sup>m</sup>	81.4 ± 5	82.8 ± 5.2
HBE cell count (10 <sup>3</sup> /vial) <sup>m</sup>	801 ± 156	994 ± 161
HBE cell seeding efficiency (%) <sup>m</sup>	53 ± 9.7	58.4 ± 14.1
HBE cell doubling time (h) <sup>m</sup>	22.8 ± 4.3	28.2 ± 7.5

<sup>a</sup>: expressed either as number, or as mean value ± SD

<sup>m</sup> = Mann-Whitney U test

<sup>k</sup> = Chi<sup>2</sup> test ( \* : p<0.01)

**Table 2: Size distribution of bulk AW and SS PM<sub>2.5</sub>**

Season	PM size distribution			
	Volume		Number	
	Mean (nm)	Fraction (%)	Mean (nm)	Fraction (%)
AW	5441 ± 645.4	2.9	993.4 ± 295.9	16.1
	1214 ± 307.7	95.9	172.3 ± 32.83	73.9
	186.4 ± 36.2	1.2		
SS	4908 ± 860.2	3.7	972.5 ± 315.4	7.3
	1215 ± 462.4	91.5	184.5 ± 93.03	92.7
	205.9 ± 56.75	4.8		

**Table 3: Elemental concentrations of bulk AW and SS PM<sub>2.5</sub>**

[Element] (µg/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>	[Element] (µg/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>
As	15.8	15.2	Sc	3.0	2.6
Ba	471	290	V	50.5	42.5
Cd	5.7	9.4	Al	15,929	11,633
Ce	23.5	17.3	Ca	45,001	30,417
Co	7.8	6.8	Fe	24,897	18,126
Cs	1.8	2.7	K	8,013	6,515
Cu	6,727	694	Mg	8,606	7,925
Hg	12.6	18.4	Na	39,148	41,329
La	13.7	13.0	Si	53,681	39,461
Li	14.5	10.6	Sn	160	91
Mn	430	445	Sr	158	119
Mo	212	27.3	Th	2.4	1.7
Ni	61.7	53.9	Ti	1,266	1,169
Pb	275	300	Tl	1.1	1.8
Pd	0.7	0.5	U	0.9	0.7
Pt	0.2	0.3	Zn	1,485	1,199
Rb	26.8	23.6	Bi	6.8	6.2
Sb	122	134	Cr	153	119
Se	20.9	25.7	∑ elements <sup>a</sup>	207,004	160,246

<sup>a</sup>: ∑ metals was calculated as the sums of elements.

**Table 4: Organic compound concentrations of bulk AW and SS PM<sub>2.5</sub>**

[PAHs] <sup>a</sup> (µg/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>	[PCDD/Fs] <sup>b</sup> (fg/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>
FLT	4.71	2.10	2,3,7,8 TCDD	< 0.03	< 0.04
PYR	4.49	1.55	1,2,3,7,8 PeCDD	< 0.07	< 0.13
BcPHE	0.77	0.25	1,2,3,4,7,8 HxCDD	0.11	< 0.11
BaA	4.03	1.00	1,2,3,6,7,8 HxCDD	0.38	0.40
CHR	5.94	1.68	1,2,3,7,8,9 HxCDD	0.24	0.33
5MCHR	0.50	0.14	1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	4.11	3.25
BeP	6.25	2.34	OCDD	9.12	7.53
BbF	10.0	4.62	∑ PCDDs	13.9	11.5
BkF	3.94	1.58			
BaP	6.86	1.86	2,3,7,8 TCDF	0.19	0.12
DalP	0.60	0.21	1,2,3,7,8 PeCDF	0.34	0.19
DahA	0.96	0.48	2,3,4,7,8 PeCDF	0.63	0.45
BghiP	7.15	2.99	1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.53	0.50
IP	7.64	2.78	1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.53	0.41
DaeP	1.81	0.74	2,3,4,6,7,8 HxCDF	0.75	0.64
ANT	1.17	0.05	1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.35	0.28
COR	2.60	1.04	1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	1.57	1.50
∑ PAHs	69.4	25.4	1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0.38	0.37
			OCDF	1.06	0.97
			∑ PCDFs	6.37	5.45
			∑ PCDD/Fs	20.3	16.9
[DL-PCBs] <sup>c</sup> (ng/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>			
PCB 81	< 0,53	< 0,80			
PCB 77	2,17	< 0,80			
PCB 123	0,43	< 0,59			
PCB 118	26,4	16,3			
PCB 114	< 0,	< 0,5731			
PCB 105	11,17	7,96			
PCB 126	< 0,44	< 0,51			
PCB 167	< 0,32	< 0,65			
PCB 156	4,35	< 0,65			
PCB 157	< 0,35	< 0,65			
PCB 169	< 0,42	< 0,74			
PCB 189	< 0,11	< 0,25			
∑ DL-PCBs	44,5	24,3			
			[M-PCBs] <sup>c</sup> (ng/g)	AW PM <sub>2.5</sub>	SS PM <sub>2.5</sub>
			PCB 28	32	28
			PCB 52	71	54
			PCB 101	28	20
			PCB 138	40	21
			PCB 153	40	19
			PCB 180	21	15
			∑ M-PCBs	233	158

<sup>a</sup>: PAHs; Polycyclic Aromatic hydrocarbons; FLA: Fluoranthene ; PYR: Pyrene ; BcPHE: Benzo[c]phenanthrene ; BaA: Benzo[a]anthracene; CHR: Chrysene; 5MCHR: 5-Methylchrysene; BeP: Benzo[e]pyrene; BbF: Benzo[b]fluoranthene; BkF: Benzo[k]fluoranthene; BaP: Benzo[a]pyrene; DalP: Dibenzo[a,l]pyrene; DahA: Dibenzo[a,h]anthracene; BghipP Benzo[g,h,i]perylene; IP: Indeno[1,2,3-c,d]pyrene; DaeP: Dibenzo[a,e]pyrene; ANT: Anthanthrene; COR: Coronene. ∑PAHs was calculated as the sums of PAHs.

<sup>b</sup>: Tera- (T), Penta- (Pe), Hexa- (Hx), Hepta- (Hp), and Octa (O)-chlorinated Dibenzo-*p*-Dioxin (PCDDs) and Dibenzo-Furans (PCDFs) detected in the fine fraction of air pollution-derived Particulate Matter (PM<sub>2.5-0.3</sub>). ∑PCDD, ∑PCDF, and ∑PCDD/Fs were calculated as the sums of PCDDs, PCDFs, or PCDDs and PCDFs, respectively.

<sup>c</sup>: DL-PCB: Dioxin-Like PolyChlorinated Biphenyls; M-PCB: marker PolyChlorinated Biphenyls. ∑DL-PCB and ∑M-PCB were calculated as the sums of DL-PCB and M-PCB, respectively.



Table 5: Histone modifications in NHBE and COPD-DHBE cells exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>

Season	Exposure (n)	[PM] ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Cell	Histone modification (Fold change vs control)			
				H3K4me3	H3K9ac	H3K27ac	H3S10ph
AW	1	10	NHBE	1.18 $\pm$ 0.16	1.34 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	1.30 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	1.11 $\pm$ 0.11
			COPD-DHBE	1.44 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	1.98 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup> , <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup> , <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>
		2	NHBE	1.18 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.18	1.25 $\pm$ 0.25	1.14 $\pm$ 0.08
			COPD-DHBE	1.49 $\pm$ 0.20 <sup>*</sup>	1.57 $\pm$ 0.27 <sup>*</sup>	1.88 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>	1.37 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>
			NHBE	1.57 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>	1.91 $\pm$ 0.30 <sup>**</sup>	1.85 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	1.36 $\pm$ 0.16 <sup>**</sup>
			COPD-DHBE	2.39 $\pm$ 0.37 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	2.94 $\pm$ 0.47 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	2.74 $\pm$ 0.40 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	1.94 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>
	3	10	NHBE	1.05 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.12	1.10 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.05
			COPD-DHBE	1.27 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup>	1.37 $\pm$ 0.23 <sup>**</sup>	1.66 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	1.20 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup>
		2	NHBE	1.04 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>	1.26 $\pm$ 0.16 <sup>*</sup>	1.08 $\pm$ 0.09
			COPD-DHBE	1.30 $\pm$ 0.12 <sup>**</sup>	1.88 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup> , <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.30 <sup>**</sup> , <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.12 <sup>**</sup>
			NHBE	1.20 $\pm$ 0.14	1.20 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.16	1.14 $\pm$ 0.10
			COPD-DHBE	1.46 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	1.58 $\pm$ 0.28 <sup>**</sup>	1.75 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	1.26 $\pm$ 0.13 <sup>**</sup>
SS	3	10	NHBE	1.40 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	1.84 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>	1.68 $\pm$ 0.20 <sup>**</sup>	1.30 $\pm$ 0.16 <sup>**</sup>
			COPD-DHBE	2.06 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	2.60 $\pm$ 0.34 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	2.48 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup> , <sup>b</sup>
		2	NHBE	1.20 $\pm$ 0.14	1.20 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.16	1.14 $\pm$ 0.10
	COPD-DHBE		1.46 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	1.58 $\pm$ 0.28 <sup>**</sup>	1.75 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	1.26 $\pm$ 0.13 <sup>**</sup>	
	NHBE		1.04 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>	1.26 $\pm$ 0.16 <sup>*</sup>	1.08 $\pm$ 0.09	

### **3. Article 3 : Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: toxicological perspectives**

**Auteurs :** B Leclercq, L.Y Alleman, E Perdrix, V Riffault, M Happillon, A Strecker, J.M Lo Guidice, G Garçon and P Coddeville.

Cet article est actuellement en soumission

#### **Contexte et résultats de l'étude**

Les PM<sub>2.5</sub> sont associées à l'augmentation de la prévalence de pathologies cardio-pulmonaires ceci étant lié à l'efficacité des mécanismes de défense cellulaire et de clairance pulmonaire mais aussi aux interactions physicochimiques entre les différents composés chimiques contenus dans les particules et à leur solubilité dans les fluides pulmonaires (Goix et al., 2016 ; Guney et al., 2016 ; Wiseman et al., 2015). La solubilité des composés chimiques, également appelée bioaccessibilité, est un paramètre important qui contrôle leur libération et leur toxicité à une échelle locale ou systémique. Depuis une quinzaine d'années, la bioaccessibilité, notamment des métaux, est étudiée sur différents milieux du plus simple, l'eau, au milieu qui tente de mimer les fluides bronchiques, le Gamble. Des paramètres tels que la température, le pH, le temps de contact, le ratio solide/liquide ou encore la composition de la solution d'extraction influencent la bioaccessibilité des métaux (Caboche et al., 2011). Les métaux de transition tels que le Fe ou le Cu sont potentiellement dangereux pour la santé. Ils sont impliqués dans la mise en place du stress oxydatif, par la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui représentent un des mécanismes importants impliqués dans la toxicologie des particules fines. Les différentes études s'intéressant à la toxicologie *in vitro* des particules utilisent des conditions de culture cellulaire très variables avec des milieux de culture, des temps d'exposition, des concentrations en particules différents qui peuvent fortement influencer la bioaccessibilité des différents composés chimiques voire biologiques qui composent les PM<sub>2.5</sub>. Cependant, peu d'études s'intéressent à la bioaccessibilité des métaux dans des milieux de culture cellulaire. Par conséquent, l'évaluation de la bioaccessibilité des métaux dans ces milieux est nécessaire à la meilleure compréhension des mécanismes toxicologiques induits par les particules fines.

Au cours de notre étude, nous avons évalué la bioaccessibilité des métaux particuliers dans l'eau, dans différents milieux utilisés en culture cellulaire (PBS/ LHC-9) et dans le milieu de culture LHC-9 qui a été consommé par des cellules. Nous avons pris en considération les temps de contact entre les particules et les milieux et également les différents ratios S/L. Nous avons observé une solubilité dépendante du milieu considéré, du temps d'exposition et du ratio S/L. En effet, dans l'eau désionisée, des éléments tels que le Cr, Fe, Sn et Ti présentent une faible bioaccessibilité alors que les éléments As, Ba, Cd, Sr, Tl, V, et Zn présentent une bioaccessibilité supérieure à 60%. Les éléments avec une faible bioaccessibilité dans l'eau présentent une solubilité plus importante dans le PBS ou LHC-9 alors que les éléments fortement hydrosolubles voient leur bioaccessibilité diminuée dans ces mêmes milieux. Concernant la bioaccessibilité du LHC-9 et du LHC-9 consommé par les cellules, seuls le Cd et le Zn ont présenté des différences de solubilité. Des effets dilution et temps d'extraction sont observés pour le PBS et l'eau alors qu'aucun de ces effets n'est détecté pour le LHC-9 et le LHC-9 consommé par les cellules. De manière innovante, la bioaccessibilité des métaux particuliers a été évaluée dans du mucus issu de patients atteints de broncho pneumopathies chroniques obstructives (BPCO). La bioaccessibilité est plus faible pour certains éléments (Ba, Ce, Mn, Mo, Sb, Sn), proche pour d'autres (As, Bi, Cu, Fe, La, Zn) et plus importante pour le Cr. La cytotoxicité (G6PD) et l'inflammation (IL-6 et IL-8) ont été mesurées dans les surnageants de milieux de culture de cellules BEAS-2B traitées 72h par la fraction totale, soluble et insoluble de PM<sub>2.5</sub>. Les particules (2µg) ont été pré-incubées pendant 6, 24 ou 72h avec des ratios de 1/6,000, 1/21,000, et 1/100,000 avant d'être déposées sur les cellules. Une faible cytotoxicité, associée au relargage du G6PD, a été quantifiée que cela soit dans les fractions totale, soluble et insoluble avec un peu plus de G6PD mesuré pour la fraction insoluble. Concernant l'inflammation, l'IL-6 est augmentée dans toutes les fractions avec des concentrations proches et cette sécrétion semble être dépendante du temps de contact et du ratio S/L. De même l'IL-8 est produite de manière plus importante au temps 72h de préincubation des particules avec un milieu de culture et ce pour toutes fractions.

L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance d'évaluer la bioaccessibilité dans des milieux de culture cellulaire pour mieux appréhender les études de toxicologie et également d'analyser la bioaccessibilité dans des fluides biologiques tels que le mucus pour se rapprocher davantage des conditions *in vivo*.

## Discussion et perspectives de l'article

Cette étude se différencie des études de bioaccessibilité des métaux classiquement réalisées qui se font, pour beaucoup d'entre-elles, dans l'eau ou dans des tampons salins (Midander et al., 2006 ; Santos et al., 2009 ; Oller et al., 2009 ; Mugica-Álvarez et al., 2011 ; Limbeck et al., 2012). La bioaccessibilité des métaux adsorbés sur les PM<sub>2,5</sub> est évaluée dans des milieux de culture cellulaire ou du mucus prélevé directement chez des patients. Les PM<sub>2,5</sub> que nous avons utilisées pour cette étude ont été prélevées au cours de l'automne/hiver 2013/2014, au centre de la ville de Lille et qui ont servi aux différentes études toxicologiques réalisées sur les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines (Voir article 2). Les PM<sub>2,5</sub> que nous avons prélevées ont pour sources majeures la combustion, le trafic routier et des sources crustales qui représentent 65% de la masse des PM<sub>2,5</sub>. Les PM<sub>2,5</sub> utilisées pour les essais de bioaccessibilité et de toxicologie *in vitro* sont représentatives d'un environnement urbain local.

Nous avons déterminé la bioaccessibilité des métaux particuliers dans l'eau, dans différents milieux utilisés en culture cellulaire (PBS/ LHC-9) et dans le milieu de culture LHC-9 qui a été consommé par des cellules. Dans l'eau desionisée la bioaccessibilité des métaux particuliers reste en accord avec d'autres études (Heal et al., 2005 ; Dos Santos et al., 2009). Les quelques variabilités observées entre les études sont liées à la typologie du site, à la saison d'échantillonnage ou encore à la composition et spéciation chimique des particules prélevées (Mukhtar and Limbeck, 2013 ; Wiseman et al., 2015). Toutefois, la solubilité des métaux dans l'eau ne prend pas en compte la composition parfois complexe des milieux physiologiques qui sont salins, ioniques et composés de molécules biochimiques (protéines, lipides, glucides), ce qui peut conduire à une sous-estimation ou au contraire une surestimation de la bioaccessibilité des métaux particuliers, dans ces milieux (Caboche et al., 2011 ; Mukhtar and Limbeck., 2013 ; Boisa et al., 2014). Le PBS qui est constitué d'une solution saline, est également utilisé pour l'extraction des métaux particuliers (Midander et al., 2006). Cependant, le PBS ne contient pas de fraction organique c'est pour cela que pour essayer de se rapprocher de la composition des fluides pulmonaires, des solutions mimétiques sont créées dont le Gamble dans lequel sont ajoutés de la glycine un acide aminé et du DPPC pour mimer la présence des lipides (Caboche et al., 2011). Dans cette étude nous avons évalué la bioaccessibilité des métaux dans du mucus issu de patients atteints de BPCO. Aucune étude n'a déterminé leur solubilité dans de vrais

fluides biologiques puisqu'il est difficile de s'en procurer. Sachant, pour des raisons évidentes, qu'il est impossible d'avoir du mucus de sujets sains nous avons utilisé du mucus de patients BPCO dont la composition, notamment en mucines, dont MUC5AC, peut varier (Turner and Jones., 2009). Dans nos essais, le mucus utilisé correspond à un mélange issu de 4 patients afin d'avoir suffisamment de mucus pour pouvoir reproduire les expérimentations. De manière intéressante, des variations dans la solubilisation de certains métaux sont observées comparées à celles évaluées dans l'eau. En effet, la composition saline ainsi que la présence en quantité importante de matière organique peuvent fortement influencer la solubilité des métaux. De plus, sachant que ce premier essai a été réalisé en mélangeant le mucus venant de 4 patients, il serait intéressant de mesurer la bioaccessibilité des métaux dans des mucus de patients et ce de manière individuelle cela nécessitant d'en avoir des quantités plus importantes. Avec l'objectif d'évaluer la bioaccessibilité des métaux dans des milieux de culture, nous avons estimé leur solubilité dans du LHC-9 et du LHC-9 consommé par les cellules en prenant en compte plusieurs ratio S/L et plusieurs temps de traitement. Effectivement, les tests de toxicologie des particules sont réalisés dans différents types cellulaires, avec différentes conditions de culture ou de traitement et ne prennent pas en considération la solubilité des métaux. Il est donc nécessaire d'évaluer la bioaccessibilité des métaux particuliers pour mieux appréhender les mécanismes toxicologiques inhérents aux PM<sub>2.5</sub>.

La cytotoxicité (G6PD) et l'inflammation (IL-6 et IL-8) ont été mesurées dans les surnageants de milieux de culture de cellules BEAS-2B traitées 72h par la fraction totale, soluble et insoluble de PM<sub>2.5</sub>. Les particules (2µg) ont été pré-incubées pendant 6, 24 ou 72h avec des ratios de 1/6,000, 1/21,000, et 1/100,000 avant d'être déposées sur les cellules. Ces ratios et temps de traitement correspondent à ceux classiquement utilisés dans les essais toxicologiques *in vitro* des PM. Il est intéressant de constater que toutes les fractions sont impliquées dans la faible cytotoxicité mesurée et également dans la sécrétion de l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules traitées aux PM<sub>2.5</sub>. De même, nous avons noté des effets qui peuvent varier selon les ratios S/L ou les temps de traitement. Il faut donc être vigilant lorsque des comparaisons entre différents temps de traitement ou différentes conditions de culture sont faites puisque le toxique en question évolue au cours du temps et peut exercer des effets toxiques qui sont aussi liés à ce changement d'état. De plus, les effets toxiques induits par la fraction totale ne représentent pas l'addition des fractions soluble et insoluble. En effet, ceci peut être dû à des réponses synergiques entre les composés chimiques solubles et insolubles qui

peuvent potentialiser ou au contraire défavoriser les réponses toxiques induites par les PM. Il est également probable que les mécanismes de pénétrance des toxiques dans les cellules sous leur forme soluble ou adsorbée aux particules soient différents et peuvent donc influencer les réponses cellulaires sous-jacentes. Les résultats de bioaccessibilité des métaux particulaires ne montrent pas d'effets ratios S/L ou de temps d'incubation des particules sur la solubilité des métaux alors que les réponses toxicologiques mettent en avant de tels effets. Les métaux de transitions sont impliqués dans la toxicologie liée aux PM<sub>2.5</sub> puisqu'ils agissent dans la mise en place du stress oxydatif qui lui-même va favoriser l'inflammation dans les cellules traitées aux PM<sub>2.5</sub>. Néanmoins, ces mêmes métaux ne semblent pas expliquer les différences de réponses toxicologiques mesurées au cours des temps de traitement et des ratios, il est donc probable que d'autres composés chimiques particuliers soient impliqués dans ces mécanismes. Il est donc nécessaire d'évaluer la bioaccessibilité des autres composés particuliers dont les HAP, furanes ou dioxines.

Ces résultats mettent en avant la nécessité de mieux quantifier la bioaccessibilité des métaux liés aux PM<sub>2.5</sub> dans des milieux plus réalistes comme le mucus afin de mieux appréhender la toxicité associée à la partie soluble qui va être potentiellement transportée vers des organes périphériques via la circulation systémique ou insoluble qui va rester au niveau des poumons. Il est également indispensable de mesurer la solubilité des métaux dans le cadre d'études toxicologiques *in vitro* et ce en faisant varier les solutions, les temps de traitement et les ratios S/L. En effet, ces études peuvent permettre d'ajuster les paramètres pour essayer de se trouver dans des conditions optimales de solubilisation des composés chimiques particuliers. Pour cela il est nécessaire de mieux comprendre la solubilité des métaux particuliers dans les fluides pulmonaires mais aussi d'essayer de savoir quel est le ratio S/L dans les poumons suite à l'inhalation des particules ou encore combien de temps elles restent en contact avec les fluides pulmonaires avant d'être éliminées. Il est difficile de répondre à toutes ces questions qui pourraient pourtant donner des arguments nécessaires à l'ajustement des paramètres d'exposition des cellules aux particules afin de se rapprocher, toujours plus, des vraies conditions d'exposition.



# Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: toxicological perspectives

B r n ce Leclercq<sup>a,b,c</sup>, Laurent Y. Alleman<sup>a,b,\*</sup>, Esperanza Perdrix<sup>a,b</sup>, Véronique Riffault<sup>a,b</sup>, Mélanie Happillon<sup>a,c</sup>, Alain Strecker<sup>d</sup>, Jean-Marc Lo-Guidice<sup>a,c</sup>, Guillaume Garçon<sup>a,c</sup>, and Patrice Coddeville<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Université de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>b</sup> Mines Douai, SAGE, F-59508 Douai, France

<sup>c</sup> Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, France

<sup>d</sup> CH Wattrelos, Wattrelos, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 27712624; fax: +33 3 27712917.

E-mail address: [laurent.alleman@mines-douai.fr](mailto:laurent.alleman@mines-douai.fr) (L.Y. Alleman).

## Abstract

According to the literature, tiny amounts of transition metals in fine particles (PM<sub>2.5</sub>) are involved in the pro-inflammatory cell responses, triggering cell oxidative stress through reactive oxygen species' production. The solubility of particle-bound metals in physiological fluids, i.e. the bioaccessibility of metals, is an important parameter that partly controls the toxicological mechanisms induced by fine particles. PM<sub>2.5</sub> toxicity is related to harmful species bioaccessibility, which is driven by factors such as the solution chemical composition, the contact time with the particles, and the solid-to-liquid phase ratio (S/L). In this work, different fluids (H<sub>2</sub>O, PBS, LHC-9, and human respiratory mucus), S/L conditions (from 1/6,000 to 1/100,000), and exposure times (6, 24 and 72 hours) have been tested with urban PM<sub>2.5</sub> samples. For the first time, metal solubility was evaluated in human respiratory mucus collected from actual COPD patients which represents a highly relevant fluid to study harmful effects of PM<sub>2.5</sub> towards the target bronchial compartment. In addition, PM<sub>2.5</sub>-bound metal bioaccessibility was assessed in cell culture media (PBS, LHC-9) and metals' total, soluble and insoluble fractions in LHC-9 were deposited on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to measure their cytotoxicity and inflammatory responses (i.e., G6PDH activity, secretion of IL-6 and IL-8). We confirmed that the bioaccessibility is solution-dependent. A higher salinity or organic content may increase the bioaccessibility in some cases or inhibit it for a few metals, as observed in the complex mucus matrix. Decreasing the S/L ratio may also affect the bioaccessibility depending on the solution tested while the exposure time appears less critical as long as sufficient time is allowed for a quantitative solubility. Both soluble and insoluble fractions can be linked to the PM<sub>2.5</sub>-induced cytotoxicity or inflammation. The metal bioaccessibility of the total, soluble, and insoluble fractions of the PM<sub>2.5</sub> under study did not explain, alone, the cytotoxicity neither the inflammatory response observed in BEAS-2B cells. These findings confirming the need to perform further studies to better evaluate the synergetic bioaccessibility of both metals and organic species coated onto PM<sub>2.5</sub>.

Keywords: bioaccessibility, trace metals, mucus, cell culture media, cytotoxicity, inflammation.

## Introduction

In vitro toxicological assays performed on human bronchial epithelial cells are powerful tools to evaluate various health impacts or to study specific biological response mechanisms initiated by inhaled pollutants such as fine particles (PM<sub>2.5</sub>). The World Health Organization (WHO) estimates that PM<sub>2.5</sub> exposure contributes to 3% of cardiopulmonary and 5% of lung cancer deaths yearly, making it the 13th cause of mortality worldwide [1]. Indeed, when exposed to particulate air pollutants, the population may develop both respiratory and cardiovascular diseases linked to complex chemical and biological interactions between particle components, physiological fluids covering the respiratory tract, and defense mechanisms of pulmonary epithelial cells [2, 3, 4]. The solubility of chemical compounds present at the airborne particle surface interacting with these physiological fluids is also called bioaccessibility, which is a critical and complex parameter that controls their release and potential toxicity on a local or more systemic scale [3]. Pollutant bioaccessibility is associated with particle lung



deposition and has been studied for the past 15 years, testing in vitro a variety of solutions simulating more or less the lung environment [4].

These in vitro methods are helpful in evaluating the potential toxicity of the pollutants that are readily soluble, reacting locally or becoming bioavailable and likely transferred into the systemic circulation to reach other target organs. The insoluble fraction directly in contact with the epithelial cells may locally affect signal transmissions, cell-surface receptors sites and other mechanisms [5]. Indeed, a recent study suggests that molecular mechanisms involved in proinflammatory gene activation linked insoluble or soluble particle components can induced a direct Reactive Oxygen Species (ROS) formation, interactions with the lipid layer of cellular membranes, activation of cell surface receptors, and direct interactions with intracellular molecular targets [5].

Many of these works have demonstrated that the close correspondence of the in vitro physiological conditions matching real life characteristics is necessary to evaluate the actual bioaccessibility of the pollutants. Parameters such as body temperature, pH, contact time, solid-to-liquid ratio (S/L), finely-tuned composition of the extraction solution, including bioorganic compounds, are also important factors that need to be considered [6]. Recent reviews on the subject have highlighted the lack of standardized methods to estimate the elemental solubility within the human lungs [4, 7, 8, 9].

Transition metals (e.g., Fe, Cu) are mainly considered in these works as they are potentially harmful [10, 11] through ROS production such as the hydroxyl radical ( $\bullet\text{OH}$ ), which represents an important mechanism underlying the particle-induced health effects [12].

Considering that only 18 to 20 mL of pleural fluids are present in the human lungs, previous studies [6, 13] have shown that the ratio between the amount of particles and the volume of extracting solution is a critical parameter to avoid saturation of the solution or competition/complexation between constituents that could underestimate the bioaccessibility of some critical elements. Likewise, the extraction time (i.e., also defined as the contact time between the particles and the solution) has been investigated, from a few minutes to hundreds of hours, in various studies [6, 14, 15]. They also concluded that short extraction times could limit the complete dissolution of some elements while long periods could lead to precipitation of some compounds. For example, Caboche et al. [6] obtained an optimum bioaccessibility after 24 hours of extraction on various particle airborne-like standard reference materials while Wragg and Klinck [15] suggested that a 100 hour duration test could lead to conservative results for Pb in the PM10 size fraction of contaminated soils.

Most toxicologists working on primary cultures or cell lines of human epithelial cells exposed to atmospheric particles are usually using particular physiological conditions compatible with the cell culture conditions (e.g., adherent or suspension cells or even air-liquid interface) and the toxicological endpoints under study [16, 17, 18]. Indeed, cells are cultured in specific nutritive media (e.g., amino acids, carbohydrates, vitamins, minerals) containing balanced salt solutions (e.g., PBS, DPBS, HBSS), favoring their survival or growth. In addition, the quantity of airborne particles deposited on the cells, often expressed in  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , is usually large enough to promote short-term toxicological effects by producing a cell stress response while avoiding any major death cells (i.e., non-cytotoxic doses) [19, 20, 21, 22, 23]. Finally, in such in vitro studies, the contact time between particles and cells may vary from a few hours to a few days after single or sometimes repeated exposures. For example, Gray et al. [24] performed a trial to evaluate the bioaccessible fraction of mercury from mines waste calcine using water and physiological fluids including a modified Gamble solution and a cell culture medium (RPMI-1640). They evidenced significant differences in the solubility of Hg depending on the solution, with a lower bioaccessibility observed with the cell culture medium. However, few studies were focused on metals bioaccessibility in cell culture media and none of them took into consideration the cell exposure time, the S/L ratio or the presence of cellular secretions.

In the current investigation, we developed an original strategy in order to better evaluate the bioaccessibility of metals contained in airborne particles with the aim of being closer to the specific physiological conditions. To this purpose, PM2.5 were collected during winter time in an urban environment and submitted to five different physiological-like solutions at given S/L ratios and contact times, from water to human respiratory mucus. More precisely, metals bioaccessibility was performed in: (1) PBS or (2) LHC-9 culture medium, which were compared to (3) water as well as (4) LHC-9 culture medium consumed by BEAS-2B cells, or even more realistic (5) mucus-containing respiratory fluids collected from actual patients. To demonstrate the need to take into account this concept and fully apprehend the toxicological results and the mechanisms behind, the total, soluble and insoluble PM2.5 fractions, were tested on human bronchial epithelial BEAS-2B cells for various toxicological endpoints. Cytotoxicity was evaluated through extracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (G6PD), and inflammatory response through the secretion of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8). A critical evaluation regarding the limits of the cell culture generally used is discussed according to the measured bioaccessible fractions.

## Materials and methods

### 1. Site descriptions and sampling protocol

The city of Lille (in the Nord-Pas-de-Calais region, NPdC, North of France) has a population of about 230,000 inhabitants (density: 6600 inhab/km<sup>2</sup>) and constitutes the heart of a regional metropolis of more than 1 million inhabitants. The sampling site located in the center of Lille is surrounded by medium-size buildings and located less than 500 m from a high traffic express line (N265) and a large train station. The NPdC region is frequently exceeding the yearly PM<sub>2.5</sub> target value (20 µg m<sup>-3</sup>) and the PM<sub>10</sub> limit value (40 µg m<sup>-3</sup>) set by the EU air quality directive [25].

Fine particles (PM<sub>2.5</sub>) were collected on the roof-top of a building at about 15 m above ground using a High Volume Tish cascade impactor (Tish Environmental) during the cold season from November 2013 to April 2014. The air sampler operates at 35 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> on 6 stages from 0.39 µm to 10.2 µm, but only the last 3 stages collecting particles with a median aerodynamic diameter below 2.1 µm (hereafter called PM<sub>2.5</sub>) were retrieved. Each stage was covered with adhesive Teflon stripes in order to easily transfer the particles with a Teflon tip into an acid-cleaned dry vial. The total mass of particles collected during the campaign and referred as the bulk sample was about 800 mg. The PM<sub>2.5</sub> bulk sample was kept at -20°C after sampling until chemical analyses, handling for bioaccessible extractions or toxicological assays.

In addition, 24 hour PM<sub>2.5</sub> samples were daily collected simultaneously on 47 mm Quartz filters (QAT-UP, Pall Corporation) for EC/OC and PAHs analyses and on 47 mm PTFE filters (Zefluor, Pall Corporation) for trace elements and ion analyses in order to better evaluate the temporal variability of their chemical composition and to identify the major particle sources impacting the area. To this end, a Partisol speciation 2300 (Thermo Fisher Scientific) was deployed next to the Tish cascade impactor, running at a 10L/min flow rate, during the whole campaign. After analysis of the different daily filter samples, a chemical database was established which enables to identify the main sources of fine particles in Lille, by applying a source-receptor model (US-EPA PMF 5.0). The analytical methodology and main results of this source apportionment study are described in the supplemental file.

### 2. Elemental characterization of bulk PM<sub>2.5</sub>

Bulk PM<sub>2.5</sub> were handled in an ultra-clean laboratory to prevent both biological and trace element contaminations. Three small aliquots (about 1.2 mg) of PM<sub>2.5</sub> were sub-sampled for total metal concentrations analyses. The particles were digested [26] in a mixture of ultrapure reagents (8 mL HNO<sub>3</sub>; 0.5 mL HF; 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), at 200°C, with a microwave oven (Milestone ETHOS). The digests were adjusted to a final volume of 50 mL using ultrapure water and stored at 4°C until analyses. The methodology and quality control measurements for total metal concentration analysis (blanks, detection limits, uncertainties) were previously described in Mbengue et al. [27]. Concentrations of seven major (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na and Si) and thirty trace elements (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Hg, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V and Zn) analyzed by ICP-AES (IRIS Intrepid, Thermo) and ICP-MS (NeXion 300x, Perkin Elmer) respectively, were measured and validated through the following steps. Each sample was analyzed in triplicates in order to estimate the repeatability of the technique. Repeated measurements (every 10 samples) of blanks and quality control (QC) standard solutions were performed in the same matrix as the samples during each analytical run. An internal standard (69Ga, 103Rh) was added (1 µg L<sup>-1</sup>) to all analyzed solutions to correct the drift of the ICP-MS signal. In addition, samples of NIST SRM 2584 particles (Indoor Dust) were systematically employed as standard reference material to validate the whole extraction procedure.

### 3. Bioaccessibility estimation

In this study, we selected a phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4; Thermo Fisher, Illkirch, France) solution frequently used in biological experiments and a basal medium used for culture of human bronchial epithelial cells (Gibco LHC-9; Thermo Fisher, Illkirch, France) to estimate the urban PM<sub>2.5</sub> trace elements solubilities. For comparison purpose, a solution of ultrapure water largely employed in previously published studies [28, 29, 30] was also tested in these trials. Finally, LHC-9 culture medium consumed by BEAS-2B cells, on the one hand, and a mucus-rich solution (i.e., mucus directly collected from four different patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease, COPD, and 2-fold diluted in ultrapure water, v/v), on the other hand, were used in order to validate the specific physiological conditions present near bronchial epithelial cells.

#### 4. Chemical composition of the physiological fluids

Bioaccessible extractions with water, frequently reported in the literature as water-soluble metal fractions [29, 30, 31], are considered to be harmful [32], potentially generating cell pro-inflammatory responses by releasing ROS. Water is also more easily handled and does not introduce significant contaminations or analytical interferences. However, water-soluble extraction presents unrealistic physiological conditions in terms of chemical composition and buffering capabilities [33]. In addition, acid or alkaline components present in PM may impact the acidity of the aqueous solution and the solubility of pH-dependent elements [34]. Nonetheless, it is a good and easily reproducible reagent for comparing with particle-bound metals' bioaccessibility carried out in more realistic synthetic biological fluids [9].

The PBS solution is a buffer solution often used in biological assay. It is a water-based salt solution including NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with ion concentrations matching those of the human body in order to maintain pH and osmotic balance while providing water and inorganic ions to the cells. Most authors favor the use of extracting fluids with a higher ionic strength than water to better assess the metal bioaccessibility [9].

The LHC-9 medium is one of the widely used serum-free media dedicated to the culture of human bronchial epithelial cells [19, 20, 22]. According to Lechner and LaVeck, [35], it contains cell growth factors and hormones (retinoic acid, epinephrine, insulin, hydrocortisone, EGF, transferrin, bovine pituitary extract and T3) in a saline medium.

To the extent of our knowledge, a human respiratory mucus-rich solution has never been employed as an extracting agent for atmospheric particles. The respiratory tract epithelium's mucus forms a protective layer against pathogens and other exogenous substances. Consequently, mucus of the respiratory tract constitutes an important barrier to pollutants such as airborne particles. In this work, the mucus solution is prepared by combining four COPD-patient expectorations diluted 2-fold with ultrapure water.

#### 5. Bioaccessibility extraction procedures

A precise amount of bulk PM<sub>2.5</sub> (320 µg) suspended in 100 µL of physiological saline solution was transferred into a clean 15 or 30 mL polypropylene centrifuge tube containing a defined volume of extracting solution (i.e., H<sub>2</sub>O, PBS, LHC-9, LHC-9 culture medium consumed by BEAS-2B cells, or mucus) in order to reach a S/L ratio of 1/6,000, 1/21,000, or 1/100,000 (in g/mL), simulating reasonable exposure conditions for toxicological assays. Due to the limited amount of real human mucus available, only one S/L ratio (1/50,000) and time of contact (72h) were performed with this fluid. Samples were then placed in an incubator keeping the temperature at 37.0 ± 0.5°C to simulate the basal human temperature, while gently agitated by an orbital shaker during 6, 24 or 72 hours, at a frequency of 200 rotation per minute. Separation of the particles from the test solutions was achieved by centrifugation for 30 min at 5000g and 4°C. The resulting supernatant was rapidly transferred into a clean 15 or 50 mL polypropylene tube, acidified using 100 µL of ultrapure HNO<sub>3</sub> (63% v/v) and stored at -20°C until analysis. The bioaccessible fraction is the ratio of metal concentration measured in the leaching solutions (i.e., H<sub>2</sub>O, PBS, LHC-9, LHC-9 culture medium consumed by BEAS-2B cells, or mucus) to the total metal concentration measured after complete acid digestion. Alternatively, the insoluble fraction can also be used to calculate the bioaccessibility, depending on the best analytical results.

This procedure has been applied in parallel to 3 aliquots (about 1 mg) of the standard reference material with certified metals' concentrations NIST SRM 2786, made of Fine Particulate matter (<4 µm) in order to validate the whole procedure for each extracting solution. Most of the measured elements (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Ti, Tl, V and Zn) were validated with a recovery rate ranging between 85 and 115%. Only Ce (65%), La (78%) and Mo (70%) achieved lower recovery rates, probably due to their low abundance and speciation in the NIST 2786. This increases the analytical uncertainty due to interferences for these elements.

#### 6. Bioaccessibility analyses

The supernatant fractions containing the dissolved metals in the various solutions (i.e., water, PBS, LHC-9, and mucus) were transferred into an acid-clean polypropylene (PP) flask, completed to 50 mL and 10-fold diluted in ultrapure water before ICP-MS analyses (NeXion 300x, Perkin Elmer). Residues of the particulate fractions as well as the organic-rich mucus solutions were totally digested in a microwave oven using the same procedure as described above for the bulk PM<sub>2.5</sub> analyses. After transfer to an acid-clean PP vial completed to 50 mL with ultrapure water, they were 5-fold diluted before

ICP-MS analyses [6, 27]. Corrections of the interferences were performed using dynamic reaction cell (H<sub>2</sub>) or collision cell (He) depending of the selected isotopes. Concentrations of twenty elements (As, Ba, Bi, Cd, Ce, Cr, Cu, Fe, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn Sr, Ti, Tl, V and Zn) were finally validated following the same steps as previously detailed for the chemical characterization of the bulk PM<sub>2.5</sub>. In addition, a mass balance of the soluble and insoluble fractions was compared to the total amount of metals measured in these particles. The mass balance was validated for most elements with a recovery rate reaching (100±25%), excepted for Ba and Fe (100±40%).

## 7. Toxicological assays

### Cell and culture conditions

The BEAS-2B cell line was obtained from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Wiltshire, UK; reference: 95102433), and was originally derived from normal bronchial epithelial human cells obtained from the autopsy of non-cancerous individuals. BEAS-2B cells were cultured in CellBIND® surface plastic 75 cm<sup>2</sup> flasks (Corning; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), in LHC-9 culture medium supplemented with 2% (v/v) amphotericin B and 1% (v/v) penicillin/streptomycin solution, as published elsewhere [35].

### Cell exposure

BEAS-2B cells were seeded in 6-well CellBIND® surface cell culture microplates (Corning) at a density of 2.5×10<sup>5</sup> cells/2mL supplemented LHC-9 and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> until reaching 80% sub-confluency. Culture supernatants were removed to eliminate non-adherent cells and microplates were chosen at random as negative control cells (i.e., supplemented LHC-9) or as exposed cells (i.e., total, soluble, or insoluble PM<sub>2.5</sub> fractions at 2µg cm<sup>-2</sup> with 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000 S/L ratios, and the 6, 24 or 72h contact times between the PM<sub>2.5</sub> and the LHC-9 leaching solution, during 72h).

### Toxicological endpoints

Twenty-four hours later, cytotoxicity in BEAS-2B cells was studied by evaluating extracellular G6PD activity (Vybrant Cytotoxicity Assay Kit, Thermo) in cell-free culture media, according to the manufacturer's recommendations. Thereafter, the secretion of the proinflammatory cytokines under study (i.e., IL-6, and IL-8) was studied in cell-free culture supernatants using commercially available enzyme immunoassays (Human, IL-6 ELISA Kit-Human, and IL-8 ELISA kit-Human, Thermo), following the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

G6PD activity, IL-6 concentration, and IL-8 concentration from exposed BEAS-2B cells (i.e., total soluble, or insoluble fractions of PM<sub>2.5</sub> at 2µg cm<sup>-2</sup> with 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000 S/L ratios, and 6, 24 or 72h contact times between the PM<sub>2.5</sub> and the leaching solutions, during 72h) were compared with those from negative control cells (i.e., supplemented LHC-9) using the Mann-Whitney U test, with p value correction for multiple comparisons. Statistical analyses were performed with the IBM SPSS Software (v20) (IBM SPSS Software, Inc., USA). Statistically significant differences were reported with p values <0.05.

## Results and discussion

### 1. Total trace metal concentrations

The elemental concentrations of the PM<sub>2.5</sub> are reported in the table 1. For most elements, these concentrations were rather comparable to previous measurements performed in the north of France by Mbengue et al. [27] and Dergham et al. [20] in the industrial region of Dunkirk in 2012. However, concentrations of Cu, Mo, Sb, and Ti were significantly higher (30 to 90%) in the PM<sub>2.5</sub> at the urban site while Cr, Mn, and Ni, generally emitted by industrial activities [27], were logically more enriched at the industrial site (120 to 260%).

**Table 1**Total elemental concentrations (in  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in the bulk PM2.5

Elements	As	Ba	Cd	Ce	Co	Cs	Cu	Hg	La	Li	Mn	Mo	Ni
conc. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	15.8	471	5.7	23.5	7.8	1.8	6727	12.6	13.7	14.5	430	212	61.7
Elements	Pb	Pd	Pt	Rb	Sb	Se	Sc	V	Al	Ca	Fe	K	Mg
conc. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	275	0.7	0.2	26.8	122	20.9	3	50.5	15929	45001	24897	8013	8606
Elements	Na	Si	Sn	Sr	Th	Ti	Tl	U	Zn	Bi	Cr		
conc. ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	39148	53681	160	158	2.4	1266	1.1	0.9	1485	6.8	153		

In the bulk PM2.5, elements like As, Bi, Cd, Cr, Cu, Pb, Mo, Sb, Sn, Zn presented enrichment factors (i.e., EF, taking Al as reference element) related to the average continental crust [37] above 10, clearly associated to urban activities (car traffic, residential heating). Copper, Sb and Zn are known tracers of non-combustion traffic sources (brake pads and tires wears) [38, 39, 40] while Cd, Pb, As, Mo and Bi may be associated to coal combustion [41, 42]. Elements such as Ce, K, Rb, Sc, Si, Th, Ti, U presented low EF, closed to 1, indicating mainly natural origins while the other elements had intermediate EF values suggesting both natural and anthropogenic sources.

## 2. Source identification of the daily PM2.5 samples

The mean PM2.5 mass concentration measured from November 28th 2013 to April 5th 2014 at a station from the local air quality *monitoring network* (Lille Fives, *Atmo Nord-Pas-de-Calais*) near our sampling site was  $19.8 \mu\text{g m}^{-3}$ . By comparison, since 2015, the European Directive 2008/50/CE has defined a  $25 \mu\text{g m}^{-3}$  annual mean of PM2.5, whereas, the WHO indicated a  $10 \mu\text{g m}^{-3}$  annual mean of PM2.5 as air quality guideline value [1, 25]. The mean concentrations of PM2.5 measured in Lille and reported in this work were comparable with those found in other urban areas in Europe and in France [43]. The source apportionment PMF5.0 model (US-EPA) was applied on the final PM2.5 chemical speciation database including 58 daily samples and 23 variables (see Supplemental file for details). We were able to identify 7 factors attributed to the following sources listed in decreasing order of their relative contribution: (1) Combustion mainly from biomass burning (31.4%), (2) Secondary mainly inorganic aerosols (19%), (3) Crustal matter (14.4%), (4) Coal or heavy fuel combustion (13.9%), (5) Aged sea salt (10.7%); (6) Road traffic (5.6%) and (7) Fresh sea salt (5.0%).

During winter time, combustions from different sources may represent a large part of the PM2.5 mass fraction. As the average temperatures was  $7^\circ\text{C}$  during the campaign, residential heating was, as expected, a significant contributor estimated at 45% of the PM2.5 mass concentration. ,Cazier et al. [43] have recently collected six air pollution-derived PM2.5 samples in the north of France during two contrasted seasons (i.e., spring-summer and autumn-winter) under three distinct influences (i.e., urban, industrial, and rural) to compare their respective chemical composition along the seasons. They reported that, if the concentration of particles under rural influence remained the same along the seasons, those observed under urban and industrial influences increased by about a third in winter. Indeed, combustion activities mainly generate PM2.5 that are significantly higher in winter (e.g., contributions from residential heating). Accordingly, in our work, local sources including combustion, road traffic and crustal emissions represented at least 65% of the PM2.5 mass, suggesting that the particles used for our bioaccessibility and toxicological assays were well representative of local urban fine particle emissions in wintertime.

## 3. Bioaccessibility results and discussion

Bioaccessibility of metals in artificial or real biological fluids

Various chemical compositions of extracting solutions, contact times and S/L ratios were tested. In de-ionized water (Fig. 1), elements like Cr, Fe, Sn, and Ti display a very low solubility (< 5%) while As, Ba, Cd, Sr, Tl, V, and Zn present high values (>60%). Similar findings were obtained in previous works dealing with water solubility of metals in PM2.5 [28, 30]. However, some variability has been observed between studies depending on the sampling season or the site typology that greatly influence the

chemical content and speciation of the airborne particles and consequently, the metal water solubilities [4, 9].

In synthetic physiological-like fluids (Fig.1) commonly used in biological studies (e.g., PBS, cell culture medium, pure LHC-9 and LHC-9 after contact with cells), the solubility was similar, lower or higher than in water, depending on the element. Elements like As, Fe, Mn, Ni, Sb, Sr, and V display bioaccessible values rather comparable to pure water while Ba, Mo, Tl, and Zn presented lower values. Conversely, Cr, Sn, Ti and to a lesser extent Pb and Bi had a higher bioaccessibility in solutions with a higher ionic strength and polarity than water. Elements with low solubility in water tend to increase their solubility in PBS and LHC-9 solutions (except for iron) while highly water-soluble elements tend to see their bioaccessibility reduced. Such a behavior demonstrates the impact of the solution composition in contact with the particles as already highlighted in a publication on the subject [4]. For instance, Caboche et al. [6] found that the solubility of metals in water, with pH 7.4, was generally lower when comparing leaching procedures, in a modified Gamble's solution containing the DPPC surfactant, tested for different standard reference materials such as NIST 1648a, NIES 8, NIST 2584 and BCR38. We could not observe such a general phenomenon since the water-based bioaccessibility in our study appears more element- and speciation-dependent. It is also worth noticing that our bioaccessibility values are generally higher than in this previous work. This discrepancy may be attributed to the different types of particles tested. In the present work, the fine particles (PM<sub>2.5</sub>) were freshly collected while the standard reference materials previously used by Caboche et al. [6] presented coarser fractions and were tested many years after being processed and validated. These aged particles may have experienced deeper oxidation processes and reacted differently in contact with water. Heal et al. [30] reported a higher bioaccessibility of the finer fraction for 11 elements when comparing PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub>, which was interpreted as a higher solubility of the anthropogenic species in the fine fraction. Small differences in pH may also influence the solubility of the metals as the water pH was around 7 in our experiments.

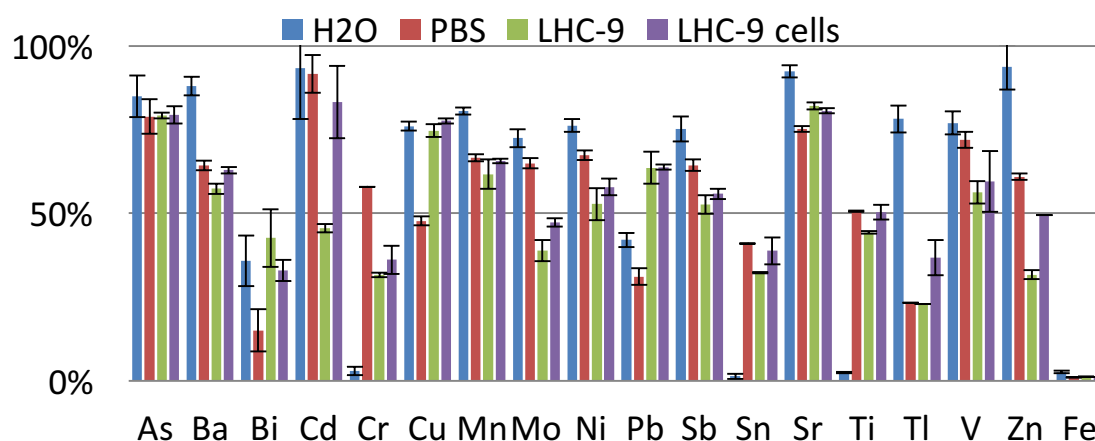


Fig. 1. Bioaccessibility of PM<sub>2.5</sub> trace elements in various extraction solutions after 72 h of extraction time and with a S/L ratio of 1/100,000. The error bars represent the standard deviation of triplicates.

Parameters like pH and ionic strength that may influence dissolution, competition or stabilization processes are often evoked as explaining factors. For instance, Wiseman and Zereini [44] demonstrated that the solubility was strongly controlled by the pH of the extracting solution, considering the higher relative mobility of several metals in PM<sub>1</sub>, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> with the acidic artificial lysosomal fluid (pH = 4.5) compared to the neutral Gamble solution. The salinity of the extracting fluid was also considered to be a very significant parameter by Da Silva et al., [45] which could lead to an underestimation of the bioaccessibility of some metals (Cu, Mn, Ni, Pb and Zn) if below the actual salt content of the interstitial fluids (10.2 g/L) but was satisfactory for others (Cd, Co). However, since the trials conditions, the chemical composition of the extracting solution and the type of particles tested (PM<sub>10</sub>) were different in this previous work, it could be misleading to directly compare results and draw general conclusions.

For the extraction test with the LHC-9 culture medium previously consumed by BEAS-2B cells during three culture days, the PM<sub>2.5</sub>-exposed LHC-9 media were sampled and quickly stored at -20 °C before being used for bioaccessibility assays. This specific test was performed in order to evaluate the role of the human cells secreting various proteins and lipids that may act as complexing agents in the solution. Indeed, a chelating agent such as EDTA was employed in earlier works [34], revealing the impact on the solubility of some elements like Pb whose bioaccessibility increased compared to an acetate buffer solution. In our case (Fig. 1), no significant bioaccessibility changes, besides those for Cd and Zn, were

observed between LHC-9 culture medium and LHC-9 culture medium (not shown) consumed by BEAS-2B cells, suggesting no major additional effect due to the cells themselves, at least in those specific experimental conditions mimicking toxicological assays. However, due to the difficulty to expose the solution to the cell and collect it without bias, this assay may induce some large uncertainties that are procedure-dependent.

The mucus from COPD patients is usually thicker and contains more mucins than the one from healthy individuals [46]. This is why the mucus collected in this study was 2-fold diluted with a physiological saline solution, in order to approximate the mucus composition of healthy lungs. Moreover, Turner and Jones [47] reported that respiratory diseases such as COPD are characterized by increased numbers of mucus-producing goblet cells and excessive mucus production, notably through mucin MUC5AC aberrant secretion, which contributes to the underlying disease pathology.

In the mucus solution (Fig. 2), the bioaccessibility tends to be lower than in water for some elements (Ba, Ce, Mn, Mo, Sb, Sn), similar for a few (As, Bi, Cu, Fe, La, Zn) but higher for Cr. While it is difficult to determine the specific reasons for this behavior in such a complex matrix, the presence of various organic compounds acting as chelating agents or higher salt content in the mucus may have some conflicting impact on the metal solubility as discussed for PBS and LHC-9 solutions. Because mucus from COPD patient is scarce, we had to combine sources from 4 patients (i.e., 10 to 20 mL/patient) with probably specific chemical composition. Consequently, these results may not correspond totally to an accurate representation of the bioaccessibility of metal-bearing particles in COPD and/or healthy subjects. Further additional characterization of mucus composition and solubility assays should be carefully performed to better evaluate particular compartments related to metal solubility.

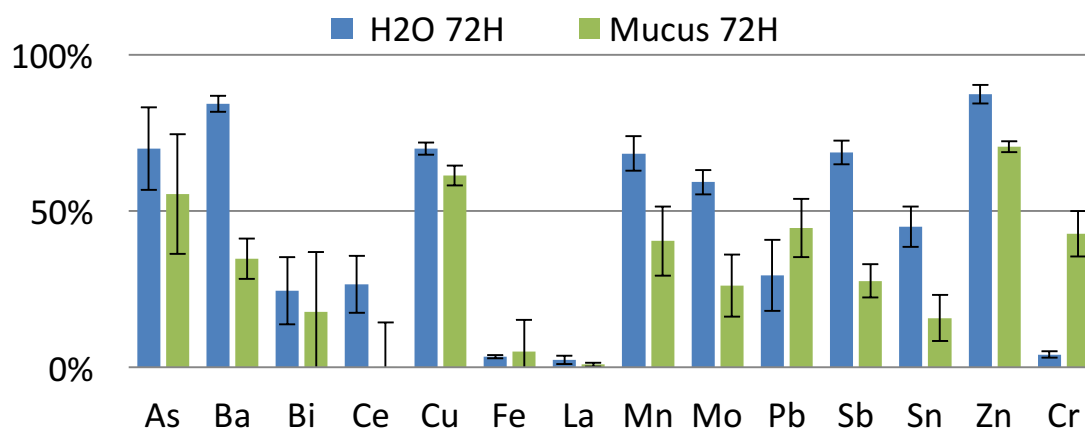


Fig. 2. Bioaccessibility of PM2.5 trace element in water and mucus solutions after 72h of extraction time and with a S/L ratio of 1/50,000. The error bars represent the standard deviation of triplicates.

#### Bioaccessibility according to the S/L ratio and the contact time

Generally speaking, in both water and PBS solutions (Fig. 3), the metal solubility tends to increase with the S/L ratio from 1/6,000 to 1/100,000, notably for the contact time between PM2.5 and the leaching solutions of 24 or 72 hours.

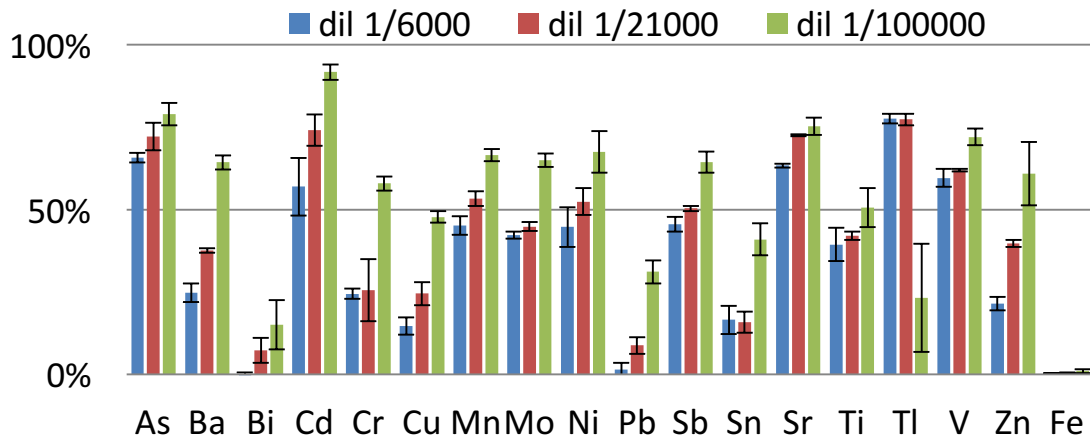


Fig. 3. Bioaccessibility of PM2.5 trace element in PBS for different S/L ratios after 72h of extraction time. The error bars represent the standard deviation of triplicates.

Conversely (Fig. 4), no clear and significant bioaccessibility trend is observed for the selected metals in the LHC-9 solutions according to the S/L ratios (i.e., LHC-9 culture medium and LHC-9 culture medium consumed by BEAS-2B cells). When taking into account the standard deviation of the triplicates, the contact time varying from 6 to 72 hours does not significantly influence the metal bioaccessibility in these experiments (Fig. 5), whatever the type of extraction solution employed, apart from few elements in the water assay (Fig. 6).

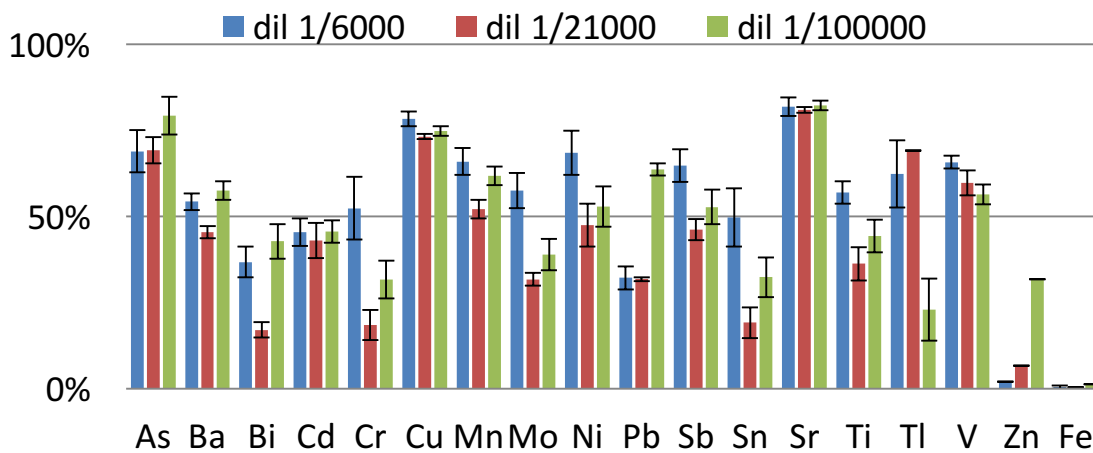


Fig. 4. Bioaccessibility of PM2.5 trace element in LHC-9 for different S/L ratios after 72h of extraction time. The error bars represent the standard deviation of triplicates.



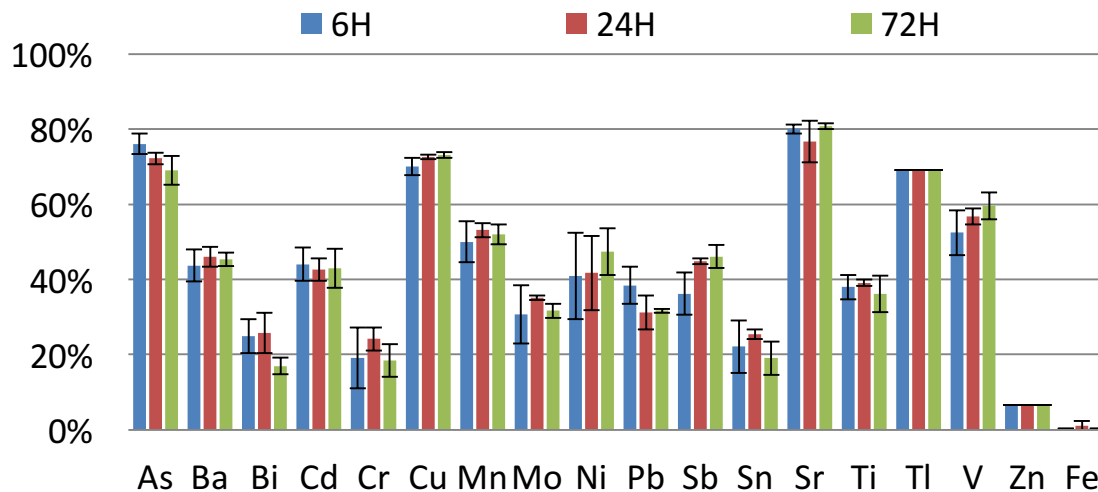


Fig. 5. Bioaccessibility of PM<sub>2.5</sub> trace element in LHC-9 for different extraction times with a S/L ratio of 1/21,000. The error bars represent the standard deviation of triplicates.

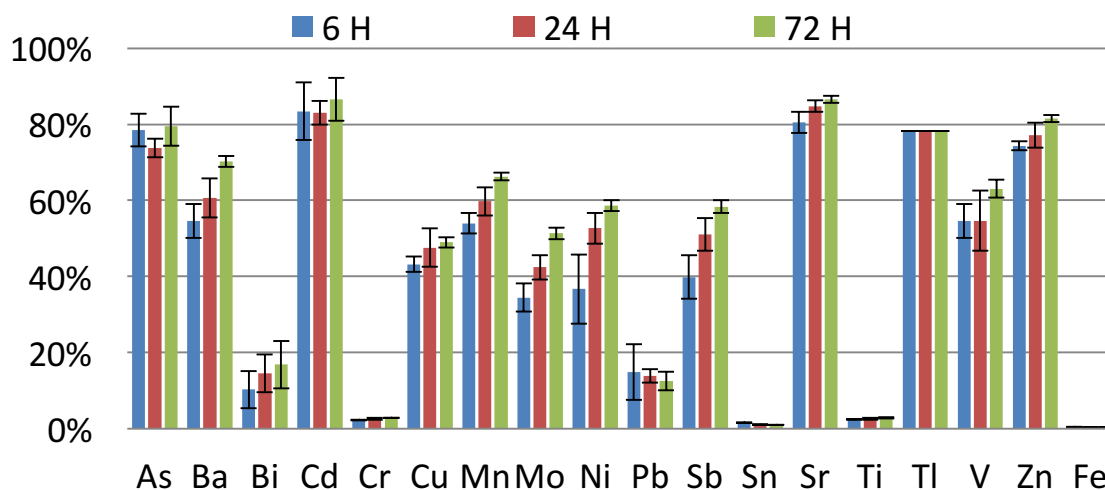


Fig. 6. Bioaccessibility of PM<sub>2.5</sub> trace element in water for different extraction times with a S/L ratio of 1/21,000. The error bars represent the standard deviation of triplicates.

This is in agreement with Caboche et al. [6], who demonstrated that the metal bioaccessibility from various airborne particle-like SRM was increasing with time, very quickly during the first 5 hours then much slowly, to reach a maximum around 24 h. These observations clearly indicated that toxicologist should be aware that some experiments where particles are less than 5 hours in contact with the cells can present solubility biases.

Many parameters may affect the solubility of the metals due to the specific procedure deployed with cultured cells (e.g., leaching agents, contact time, S/L ratio and protein release from the cells acting like chelating agents). For instance, high doses of particles deposited on cells may induce inflammatory responses leading potentially to cytotoxic responses on very short exposure time (6 to 24h) that may be driven by the rather high S/L ratios usually applied in those tests. High S/L ratios above 1/50 [48] or 1/500 g mL<sup>-1</sup> [6] have proven to reduce the relative bioaccessibility of some pollutants. This difference in S/L partitioning could impact the biological mechanism involved in the stress response of the cells. Our results tend to confirm these observations although our tests were performed at much lower S/L ratios in order to more closely mimic the actual toxicological tests conditions. This could indicate that even very low particle loading (low S/L) may impact the solubility of some compounds depending of the extracting fluid and the type of particles.

The contact time between the leaching solution and the particles can also control the bioaccessibility of metals as short time exposure (< 5h) may limit the dissolution of some elements [6]. In our trials, no contact time below 6 hours was tested, which was considered long enough to obtain satisfactory dissolution efficiencies and toxicological effects. This was globally confirmed although small discrepancies were evidenced for some elements.

#### 4. Toxicological endpoints

##### Cytotoxicity

As shown in Figure 7, the cytotoxicity occurring in BEAS-2B cells 72 hours after their exposure to the total, soluble, or insoluble fractions in LHC-9 of PM2.5 at  $2\mu\text{g cm}^{-2}$  according to the 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000 S/L ratios, and the 6, 24 or 72h contact times between the PM2.5 and the leaching solutions, was studied through the G6PD activity in cell-free culture supernatants. Cell death is often assayed using probes that can enter the cell through areas of plasma membrane damage. However, detecting G6PD activity provides an alternative method that monitors the release of this cytosolic enzyme from damaged or dying cells into the cell-free culture supernatants. Overall, there was a relatively low cytotoxicity (i.e., <2-fold-increases in G6PD activity) in the BEAS-2B cells 72h after their exposure not only to the total fraction, but also to the soluble and insoluble fractions of PM2.5.

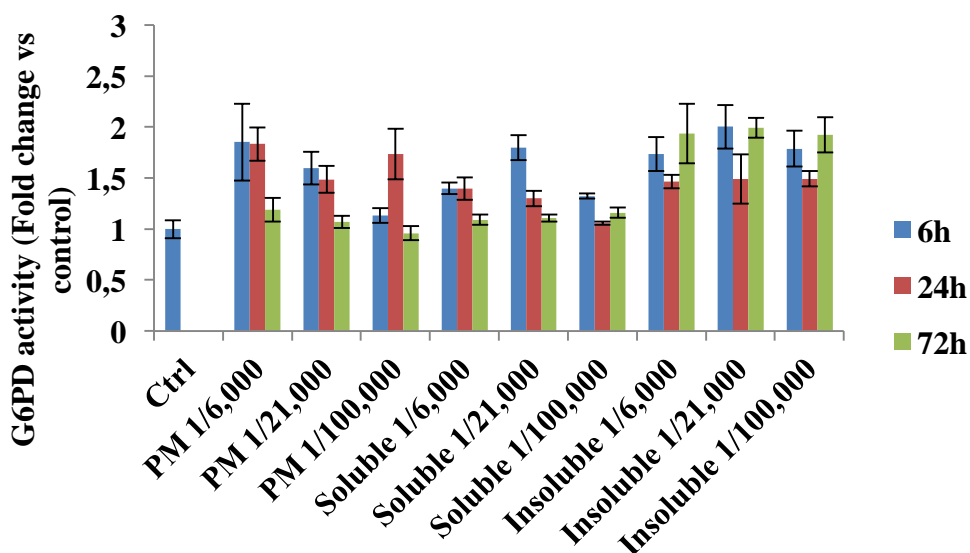


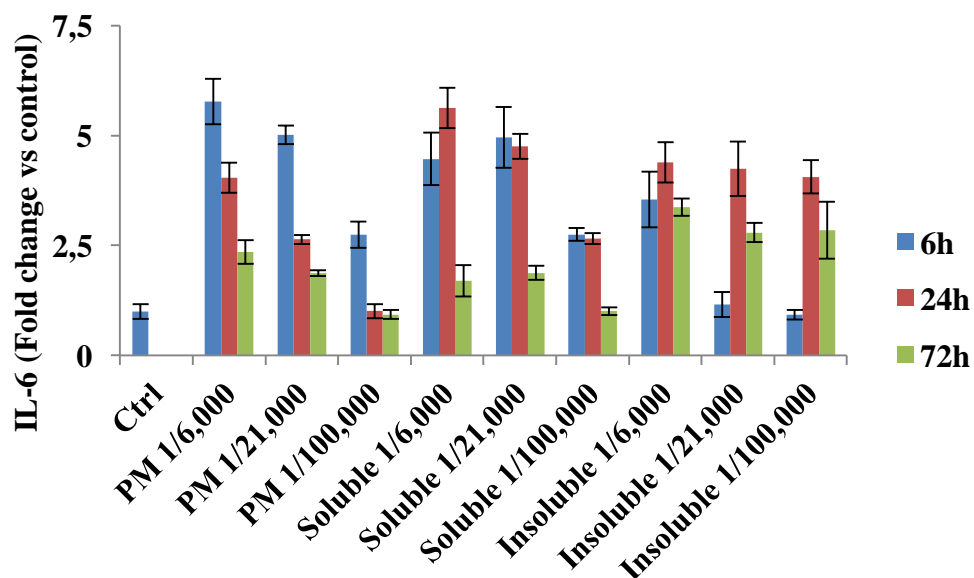
Fig. 7. G6PD activity after exposure to the total, soluble and insoluble fractions of PM2.5 for the three S/L ratios. The error bars represent the standard deviation of the replicates.

In BEAS-2B cells exposed to the total fraction of PM2.5 (referred as “PM” in Fig.7-9), there was an increasing release of G6PD compared to the non-treated control. For most experimental conditions, this increment was the highest after a contact time of 6h, i.e. less important according to decreasing S/L ratios (i.e., 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000) and increasing times of contact between the PM2.5 and the leaching solution (i.e., 6, 24, 72h). However, an elevated G6PD activity was also observed after a contact time between total PM2.5 and leaching solutions of 24h instead of 6h for the S/L ratio of 1/100,000, thereby indicating the possible influence of the S/L ratio on the bioaccessibility of some constituents within PM2.5. The soluble PM2.5 fraction induced a slight G6PD release, decreasing according to increasing contact times. In contrast to the above-described results, no clear influence of the S/L ratios (i.e., 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000) was observed. In a similar manner, exposure of BEAS-2B cells to the insoluble fraction of PM2.5 induced G6PD releases, which were neither dependent on the contact times nor on the S/L ratios (i.e., 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000). Taken together, the changes in G6PD release indicated a low cytotoxicity in BEAS-2B cells, whatever the fraction to which they were exposed (i.e., total, soluble or insoluble fractions of PM2.5). When focusing on the cytotoxicity resulting from BEAS-2B cell exposure to the total fraction as a reference, the highest cytotoxicity differences were observed for cells treated by insoluble fractions, notably for the longest contact time (i.e., 72h). Results also indicated that no significant bioaccessibility trend was observed for the selected metals in the LHC-9 solutions (i.e., LHC-9 culture medium and LHC-9 culture medium consumed by

BEAS-2B cells). Again, in view of the standard deviation of the triplicates, the contact time varying from 6 to 72h does not significantly influence the metal bioaccessibility tested in these experiments. Hence, the apparent discrepancies reported might be rather linked to the bioaccessibility of other chemical constituents within the different PM<sub>2.5</sub> fractions. In further studies, attention should also be paid on the bioaccessibility of organic species coated onto PM<sub>2.5</sub>, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated dibenzo-p-dioxin and furans (PCDD/Fs), and dioxin-like and marker polychlorinated biphenyls (DL- and M-PCBs), since they have also been measured in the bulk PM<sub>2.5</sub> under study (Leclercq et al., 2016). Nevertheless, it is important to highlight that, besides the total fraction, both the soluble and insoluble fractions of PM<sub>2.5</sub> played a key role in their cytotoxicity. It is also noteworthy that the cytotoxicity approach was performed using a relatively low dose of PM<sub>2.5</sub> (i.e., 2 μg cm<sup>-2</sup>), among the lowest reported in literature to give significantly harmful effects [19, 20, 22, 23, 36]. Based on our results, this dose inducing only a low cytotoxicity, was chosen for further toxicological endpoints studies. It is indeed important to reduce PM exposure as much as possible to simulate realistic human exposure levels while keeping the dose high enough to study underlying mechanisms.

#### Secretion of inflammatory mediators

Accumulating evidences demonstrate that PM<sub>2.5</sub>, mainly composed of combustion-derived particles with a high redox capacity, PAHs and metals, is responsible for the severe health effects, often associated with prooxidant/antioxidant imbalance and inflammatory reaction, acute response initiation as well as existing inflammatory disease exacerbation within the lung [22, 49, 50]. Inflammatory mediators (i.e., IL-6 and IL-8) were measured (Fig. 8a and 8b) in the cell-free culture supernatants of BEAS-2B cells 72 hours after their exposure to the total, soluble or insoluble fractions of PM<sub>2.5</sub> at 2 μg cm<sup>-2</sup>. Again, these assays were performed according to the 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000 S/L ratios, and the 6, 24, 72h times of contact between the PM<sub>2.5</sub> and the leaching solutions.



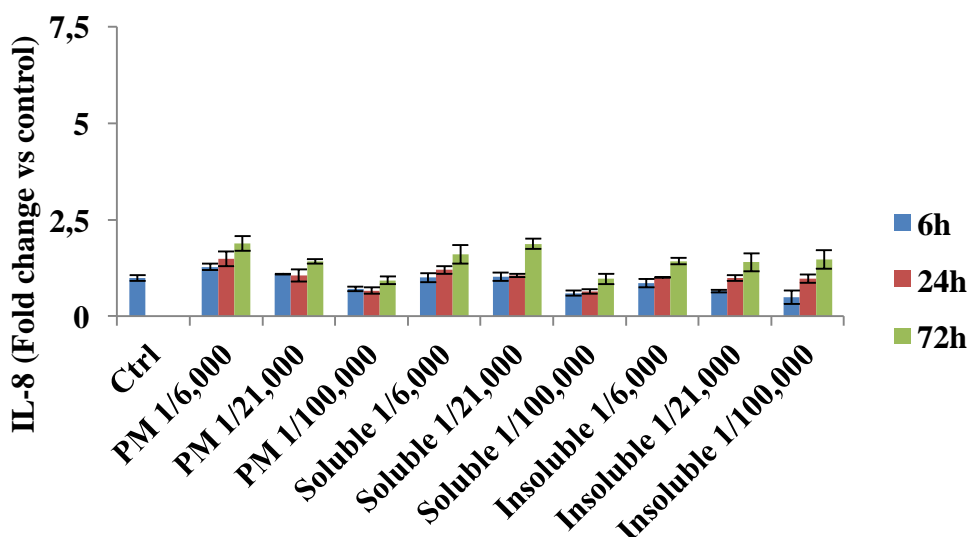


Fig. 8. IL-6 (above) and IL-8 (below) activity after exposure to the total, soluble and insoluble fractions of PM<sub>2.5</sub> for the three S/L ratios. The error bars represent the standard deviation of the replicates.

There was a statistically significant secretion of IL-6, in BEAS-2B cells exposed to the total fraction of PM<sub>2.5</sub>. This secretion was less important with decreasing S/L ratios (i.e., 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000) and the contact times. In contrast, the influence of S/L ratios and contact times was less pronounced in BEAS-2B 72 hours after their exposure to the soluble and, in particular, the insoluble fractions of the PM<sub>2.5</sub>. Accordingly with the G6PD release results, IL-6 secretion induced by the soluble and even the insoluble fractions was in a similar range of levels as those induced by the total fractions. Consequently, the contact time and probably the S/L ratios seem to be influential in IL-6 secretion. With regards to IL-8 secretion, in BEAS-2B cells exposed to the total or soluble fractions, there were statistically significant increases which are lower with decreasing S/L ratios (i.e., 1/6,000, 1/21,000, and 1/100,000) but higher with increasing contact. However, in BEAS-2B cells exposed to the insoluble fractions, despite the influence of the contact times between the PM<sub>2.5</sub> and the leaching solution, no apparent effect linked to S/L ratios was measured. Moreover, similar to the IL-6 secretion results, IL-8 secretion induced by the soluble and insoluble fractions was in a similar range as those induced by the total fractions. Again, the contact time, notably after 72h of treatment, seems to be a parameter influencing IL-8 secretion. Overall, the proinflammatory responses we observed after PM<sub>2.5</sub> exposure were also in agreement with previous results underlining the proinflammatory properties of different types of air pollution-derived PM [19, 20, 22, 36, 49, 50, 51, 52]. Interestingly, both soluble and insoluble fractions induced cell inflammatory responses but the addition of these responses does not correspond to the one driven by the total fraction. This could be due to synergistic responses between soluble and insoluble chemical elements which can potentiate or hinder cellular toxicological responses, specifically inflammation = PM<sub>2.5</sub>-induced. We can make the hypothesis that the xenobiotic cell penetrance mechanisms may be different depending on how they are presented to the cells, in their soluble form or linked to particles. These penetrance mechanisms may differ between the total, soluble and insoluble fractions and the way cells will manage the chemical cell presentation can be different too. In addition, the inflammation we quantified in the soluble and insoluble fractions can be linked to the presence of some of the metals contained in PM<sub>2.5</sub>. Lodovici and Bigagli [53] reported a correlation between PM redox-active compounds (e.g., metals, PAHs) and proinflammatory events in human bronchial epithelial cells.

The extraction time did not affect the metal bioaccessibility while cytokines secretion for both IL-6 and IL-8, tended to be influenced by contact times between the PM<sub>2.5</sub> and the leaching solution. Obviously, other chemical components are also solubilized during the PM<sub>2.5</sub> chemical extraction and a focus on their bioaccessibility within the different fractions, including organic chemicals such as PAHs and other related-compounds, is highly needed to better understand the PM<sub>2.5</sub> toxicology.

## Conclusions

Many toxicological assays studying bronchial epithelial cell responses to atmospheric particles exposure only consider the particle cytotoxicity as a criterion to adjust before being deposited on the cells. They usually introduce judicious amount of particles but in suspension in a salty solution somewhat different from the actual pulmonary physiological environment. These tests are usually performed using various time-scales or particle concentrations with single or repeated exposure experiments. However, these parameters are critical to evaluate the toxicological mechanisms.

Our results have confirmed that bioaccessibility of particulate metals is clearly solution- (salt and chelating agent sensitive) and sample loading dependent. Both soluble and insoluble fractions can be linked to the cytotoxicity or the PM2.5-activated inflammation. Parameters such as contact time or S/L ratios can influence PM2.5 toxicity in a manner that cannot yet be fully explained. Consequently, this study underlines the importance for PM2.5 toxicological studies to clearly consider the significance of the chemical species solubility, such as metals, to better understand PM2.5 toxicity mechanisms. In support of that, there is an urgent need to better study the bioaccessibility of other compounds coated onto PM2.5, with a particular interest for PAHs and other related-compounds. There is also an important need, when evaluating xenobiotic toxicological mechanisms, to be as close as possible to the in vivo conditions found in human respiratory system. Indeed, the solubility of various chemical elements and compounds has to be evaluated in more relevant solutions such as the mucus sampled from actual patients. The mucus solution tested here may represent the first attempt to evaluate the solubility in an actual human pulmonary biological fluid corroborating the behavior of metals depending on their speciation and affinity with the medium.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the ITMO Cancer (i.e., Plan Cancer 2009-2013, Contract n°ENV201210), the University of Lille, and Mines Douai. BL's PhD is supported by the Nord-Pas de Calais Region and Mines Douai (Contract n°13005131). We gratefully acknowledge Bruno Malet for its technical support in this work.

## References

- [1] World Health Organization, 2014. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. Available at [www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/).
- [2] S. Goix, G. Uzu, P. Oliva, F. Barraza, A. Calas, S. Castet, D. Point, J. Masbou, J.L. Duprey, C. Huayta, J. Chincheros, J. Gardon, Metal concentration and bioaccessibility in different particle sizes of dust and aerosols to refine metal exposure assessment. *J. Hazard Mater.* 317 (2016) 552-562.
- [3] M. Guney, R.P. Chapuis, G.J. Zagury, Lung bioaccessibility of contaminants in particulate matter of geological origin. *Environ Sci Pollut Res Int.* (2016) [Epub ahead of print]
- [4] C. L. S. Wiseman, Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. *Anal. Chim. Acta* 877 (2015) 9-18.
- [5] J. Øvrevik, M. Refsnes, M. Låg, J.A. Holme, P.E. Schwarze, Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* 5 (2015) 1399-1440.
- [6] J. Caboche, E. Perdrix, B. Malet, L.Y. Alleman, Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 621-630.
- [7] R.G. Henderson, V. Verougstraete, K. Anderson, J.J. Arbildua, T.O. Brock, T. Brouwers, D. Cappellini, K. Delbeke, G. Herting, G. Hixon, I.O. Wallinder, P.H. Rodriguez, F. Van Assche, P. Wilrich, A.R. Oller, Inter-laboratory validation of bioaccessibility testing for metals, *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* 70 (2014) 170-181.
- [8] W.E. Hillwalker, K.A. Anderson, Bioaccessibility of metals in alloys: Evaluation of three surrogate biofluids, *Environ. Pollut.* 185 (2014) 52-58.
- [9] A. Mukhtar, A. Limbeck, Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 11-25.
- [10] J. Ayres et al. Evaluating the Toxicity of Airborne Particulate Matter and Nanoparticles by Measuring Oxidative Stress Potential—A Workshop Report and Consensus Statement (2008).
- [11] F.J. Kelly, Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med.* 60 (2013) 612-616.
- [12] R.J. Delfino, C. Sioutas, S. Malik, Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 934-946.
- [13] N. Boisa, N. Elom, J.R. Dean, M.E. Deary, G. Bird, J.A. Entwistle, Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the PM10 size fraction of soil, *Environ. Int.* 70 (2014) 132-142.
- [14] J. Twining, P. McGlenn, E. Loi, K. Smith, R. Giere, Risk ranking of bioaccessible metals from fly ash dissolved in simulated lung and gut fluids, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 7749-7756.

- [15] J. Wragg, B. Klinck, The bioaccessibility of lead from Welsh mine waste using a respiratory uptake test, *J. Environ. Sci. Health Part A* 42 (2007) 1223–1231.
- [16] T.E. Gray, K. Guzman, C.W. Davis, L.H. Abdullah, P. Nettesheim, Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14 (1996) 104–112.
- [17] S. Mitschik, R. Schierl, D. Nowak, R.A. Jörres, Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: A comparative analysis of published studies. *Inhal. Toxicol.* 20 (2008) 399–414.
- [18] A.J. Ross, L.A. Dailey, L.E. Brighton, R.V. Devlin, Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37 (2007) 169–185.
- [19] L. Boublil, E. Assémat, M.C. Borot, S. Boland, L. Martinon, J. Sciare, A. Baeza-Squiban, Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol. in vitro* 27 (2013) 533–542.
- [20] M. Dergham, C. Lepers, A. Verdin, S. Billet, F. Cazier, D. Courcot, P. Shirali, G. Garçon, Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Env. Res.* 137 (2015) 256–267.
- [21] M. Gualtieri, J. Ovreik, S. Mollerup, N. Asare, E. Longhin, H.J. Dahlman, M. Camatini, J.A. Holme, Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* 713 (2011) 18–31.
- [22] B. Leclercq, M. Happillon, S. Antherieu, E.M. Hardy, L.Y. Alleman, N. Grova, E. Perdrix, B.M. Appenzeller, J.-M. Lo Guidice, P. Coddeville, G. Garçon, Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. *Env. Poll.* 218 (2016) 1074–1088.
- [23] E. Longhin, E. Pezzolato, P. Mantecca, J.A. Holme, A. Franzetti, M. Camatini, M. Gualtieri, Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol. in vitro* 27 (2013) 551–559.
- [24] J. Gray, G. Plumlee, S.A. Morman, P. Higuera, J. Crock, H.A. Lowers, M.L. Witten, In Vitro Studies Evaluating Leaching of Mercury from Mine Waste Calcine Using Simulated Human Body Fluids, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 4782–4788
- [25] European Parliament and the Council of the European Union, 2008. Air Quality -Existing Legislation. Directive 2008/50/EC of the European parliament and of the council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe.
- [26] L.Y. Alleman, L. Y., L. Lamaison, E. Perdrix, A. Robache, J.-C. Galloo, PM<sub>10</sub> metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone, *Atmos. Res.* 96 (2010) 612–625.
- [27] S. Mbengue, L.Y. Alleman, P. Flament, Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmos. Res.* 135 (2014) 35–47.
- [28] M. Dos Santos, D. Gomez, L. Dowidowski, E. Gautier, P. Smichowski, Determination of water soluble and insoluble compounds in size classified airborne particulate matter. *Microchem. J.* 91 (2009) 133–9.
- [29] J.R. Graney, M.S. Landis, G.A. Norris, Concentrations and solubility of metals from indoor and personal exposure PM<sub>2.5</sub> samples, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 237–247.
- [30] M.R. Heal, L.R. Hibbs, R.M. Agius, I.J. Beverland, Total and water-soluble trace metal content of urban background PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and black smoke in Edinburgh, UK, *Atmos. Environ.* 39 (2005) 1417–1430.
- [31] W. Birmili, A. Allen, F. Bary, R. Harrison, Trace metal concentrations and water solubility in size-fractionated atmospheric particles and influence of road traffic, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1144–1153.
- [32] D.L. Costa, K.L. Dreher, Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 1053–1060.
- [33] S. Canepari, E. Cardarelli, A. Giuliano, A. Pietrodangelo, Determination of metals, metalloids and non-volatile ions in airborne particulate matter by a new two-step sequential leaching procedure: Part A: Experimental design and optimization, *Talanta* 69 (2006) 581–587.
- [34] S. Canepari, M.L. Astolfi, S. Moretti, R. Curini, Comparison of extracting solutions for elemental fractionation in airborne particulate matter, *Talanta* 82 (2010) 834–844.
- [35] J.F. Lechner, M.A. LaVeck, A serum-free method for culturing normal bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue Cult Methods* 9 (1985) 43–48.
- [36] M. Dergham, C. Lepers, A. Verdin, S. Billet, F. Cazier, D. Courcot, P. Shirali, G. Garçon, Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) produced in rural-, urban-, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 904–919.
- [37] S.M. McLennan, Relationships between the trace element composition of sedimentary rocks and upper continental crust. *Geochem. Geophys. Geosy.* 2 (2001) 1021.
- [38] R. M. Harrison, A.M. Jones, J. Gietl, J. Yin, D.C. Green, Estimation of the Contributions of Brake Dust, Tire Wear, and Resuspension to Nonexhaust Traffic Particles Derived from Atmospheric Measurements, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 6523–6529.
- [39] J. Sternbeck, A. Sjödin, K. Andreasson, Metal emissions from road traffic and the influence of resuspension- results from two tunnel studies. *Atmos. Environ.* 36 (2002) 4735–4744.
- [40] G. Weckwerth, Verification of traffic emitted aerosol components in the ambient air of Cologne (Germany). *Atmos. Environ.* 35 (2001) 5525–5536.
- [41] Pacyna, J.M., Pacyna, E.G., 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ. Rev.* 9, 269–298.
- [42] M. Xu, R. Yan, C. Zheng, Y. Qiao, J. Han, C. Sheng, Status of trace element emission in a coal combustion process: a review. *Fuel Process. Technol.* 85 (2004) 215–237.
- [43] F. Cazier, P. Genevray, D. Dewaele, H. Nouali, A. Verdin, F. Ledoux, A. Hachimi, L. Courcot, S. Billet, S. Bouhsina, P. Shirali, G. Garçon, D. Courcot, Characterisation and seasonal variations of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas: Organic compounds. *J. Env. Sci.* 44 (2016) 45–56.

- [44] C. L. S. Wiseman, F. Zereini, Characterizing metal(loid) solubility in airborne PM10, PM2.5 and PM1 in Frankfurt, Germany using simulated lung fluids, *Atmos. Environ.* 89 (2014) 282-289.
- [45] L.I.D. Da Silva, L.B. Yokoyama, L. Maia, M.I.C. Monteiro, F.V.M. Pontes, M.C. Carneiro, A.A. Neto, Evaluation of bioaccessible heavy metal fractions in PM10 from the metropolitan region of Rio de Janeiro city, Brazil, using a simulated lung fluid, *Microchem. J.* 118 (2015) 266-271.
- [46] R. Bhowmick, H. Gappa-Fahlenkamp, Cells and culture systems used to model the small airway epithelium lung. (2016) DOI 10.1007/s00408-016-9875-2
- [47] J. Turner, C.E. Jones, Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 877-881.
- [48] K. Midander, J. Pan, C. Leygraf, Elaboration of a test method for the study of metal release from stainless steel particles in artificial biological media. *Corros. Sci.* 48 (2006) 2855-2866.
- [49] E. Longhin, L. Capasso, C. Battaglia, M.C. Proverbio, C. Consentino, I. Cifola, E. Mangano, M. Camatini, M. Gualtieri, Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ. Poll.* 209 (2016) 87-98.
- [50] J.M. Soukup, L.A. Dailey, A.J. Ghio, Particle retention by respiratory epithelial cells is associated with persistent biological effect. *Inhal. Toxicol.* 27 (2015) 335-341.
- [51] B. Zhou, G. Liang, H. Qin, X. Peng, J. Huang, Q. Li, L. Qing, L. Zhang, L. Chen, L. Ye, P. Niu, Y. Zou, P53-dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE cells) by PM2.5 sampled from air in Guangzhou, China. *Toxicol. Mech. Methods* 24 (2014) 552-559
- [52] G. Garçon, Z. Dagher, F. Zerimech, F. Ledoux, D. Courcot d, A. Aboukais, E. Puskaric, P. Shirali, Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Tox. in Vitro* 20 (2006) 519-528.
- [53] M. Lodovici, E. Bigagli, Oxidative stress and air pollution exposure. *J. Toxicol.* 10 (2011) 11-55.

## Supplemental file

### 1. Chemical characterization of the fine particles daily collected in Lille

Metal analyses: Same procedure as described in section 2.2 of the paper.

Ion analyses: Another Teflon filter collected simultaneously was used for the determination of water-soluble anions and cations concentrations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Water-soluble ions were extracted from each Teflon filter, using 10 ml of Milli-Q water in an ultrasonic bath (for 1 h) and then filtered using 2  $\mu\text{m}$ -porosity Acrodisc filters before analysis. Subsequently, ions were analyzed via Ion chromatography (Dionex IC-5000, Thermo Scientific) with conductivity detection. Dionex IonPac AS9-HC and IonPac CS16 columns were used respectively for anions and cations separation with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15mM and MSA 30 mM as respective eluents. Calibration curves were determined for every set of 10 to 15 samples and 0.5 mg l<sup>-1</sup> standards for cations and anions were analyzed every 3 samples. In addition a certified reference material (Acid Rain Water AES-05 provided by Environment Canada) was regularly employed to check the accuracy.

EC/OC analyses: The samples collected on pre-fired 47 mm QAT-UP (Pall) quartz filters (500°C for 6 h) were punched (1.5 cm<sup>2</sup>) two to three times for the determination of OC and EC concentrations. Organic carbon (OC) and elemental carbon (EC) concentrations were determined by Thermal Optical Transmission method with a Sunset Laboratory OC/EC Analyzer using the NIOSH 5040 protocol (Birch and Cary, 1996; Chiappini et al., 2014). The split point between OC and EC is based on the temperature and the purge gas used during the analysis (Schauer et al., 2003). OC is measured in the presence of He and EC is defined in the presence of a gas mixture He/O<sub>2</sub>. The charring of organic compounds formed in the analysis process is accounted for, using a laser absorbance procedure measuring the original optical transmittance (Schauer et al., 2003).

HAP analyses: Pressurized liquid extraction of PAHs collected on the quartz fiber filters was performed with a Dionex ASE 200 instrument using a stainless-steel 11-mL cell containing the particles to be extracted (about 6.2 and 11.4 mg for the summer and winter campaigns, respectively) and acetonitrile as a solvent. The extract was transferred to a collection vial after extraction and evaporated for enrichment under a gentle stream of nitrogen in a water bath held at 60°C (Zymark TurboVap II) to a final volume of 500-1,000  $\mu\text{L}$ . The analysis method by HPLC consisting of a Waters 2695 Alliance system coupled to an on-line 996 photodiode array and a 2475 fluorimetric detector is detailed elsewhere (Crenn et al., in press). Recovery efficiencies and analytical LODs were assessed for each PAH using certified sample (Urban Dust SRM1649a, NIST) and filters doped with a standard solution. Two types of blanks, including solvent blanks and filter blanks, were analyzed using the validated method. Small amounts of the other PAHs were found in the blanks, and were subtracted. A solvent blank was analyzed before and after sample analyses to check for the possible accumulation of analytes in the instrument. The method allowed for the determination of the concentrations of 17 PAHs: Fluoranthene, Pyrene, Benzo(c)phenanthrene, Benzo(a)anthracene, Chrysene, 5-Methylchrysene, Benzo(e)pyrene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Dibenzo(a,l)pyrene, Dibenzo(a,h)anthracene, Benzo(g,h,i)perylene, Indeno(1,2,3-c,d)pyrene, Dibenzo(a,e)pyrene, Anthanthrene and Coronene.

### 2. Source apportionment of PM<sub>2.5</sub> based on Positive Matrix Factorization

Based on the chemical analysis of multiple samples of PM<sub>2.5</sub> collected at the same receptor site, it is possible to identify different sources of primary and secondary particles, impacting this receptor site, and to estimate their relative contributions based upon the mass conservation equation.

For this purpose a statistical factor analysis can be conducted, considering that the samples are the observations and the measured chemical species are the variables. In this study, the Positive Matrix Factorization model PMF 5.0 from US EPA (United States Environmental Protection Agency) is used (Paatero, 1997).

The factors determined by factor analysis are distinguished from each other by their specific correlations with certain particular chemical species, called tracers, which constitute chemical signatures unique to each factor. These chemical signatures are used to identify factors with possible sources of aerosols.



In addition, by imposing a mathematical constraint of non-negativity, the positive mathematical contribution of a factor may be assimilated with the mass contribution of the associated source (Eq. (1)):

$$x_{ij} = \sum_{k=1}^p g_{ik} \times f_{kj} + e_{ij} \quad (1)$$

with :

- $x_{ij}$  : observed mass concentration of the chemical species  $j$  in the sample  $i$
- $g_{ik}$  : mass contribution of the  $k$ th source to the sample  $i$
- $f_{kj}$  : mass concentration of species  $j$  in the  $k$ th source
- $e_{ij}$  : error term.
- $p$  : number of sources considered.

### 2.1. Ionic balance

The water-soluble ions in PM<sub>2.5</sub> are made of cations and anions, whose total electrical charge must be equal to zero. Here, the ionic balance was tested for the main inorganic ions (that have been found above the detection limits of IC): ammonium, nitrate, sulfate, chloride and sodium.

It is assumed that nitrate and sulfate anions are principally counterbalanced by ammonium cations, and therefore that the Neutralization Ratio (NR), defined in Eq. (3), should in this case be equal to 1.

$$NR = \frac{[NH_4^+]}{[NO_3^-] + 2 \times [nss-SO_4^{2-}]} \quad (2)$$

where the brackets refer to molar concentration of species per cubic meter of ambient air and nss-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> is non sea salt sulfate.

In this study, the PM<sub>2.5</sub> of Lille exhibit an average NR of  $1.00 \pm 0.21$ , meaning that the assumption of existence of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> species is plausible.

### 2.2. Mass balance

Theoretically, the sum of the mass concentrations of the carbonaceous fractions, EC and OC, with those of the inorganic species, ions and metals, should not exceed the PM<sub>2.5</sub> mass concentration.

Practically, this sum may exceed the PM<sub>2.5</sub> mass concentration due to cumulated analytical uncertainties. The sum of the concentrations of the analyzed chemicals species was therefore calculated following Eq. (3) and Eq. (4):

$$\text{Sum of species concentrations} = [EC] + [OC] + [Ions] + [Metals] \quad (3)$$

$$\text{With } [Ions] = [Na^+] + [NH_4^+] + [K^+] + [Ca^{2+}] + [Cl^-] + [NO_3^-] + [SO_4^{2-}] \quad (4)$$

And [Metals] referring to the sum of the concentrations in As, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Rb, Sb, Sr, Tl, V, Zn.

By plotting the "sum of species" against PM<sub>2.5</sub>, we obtain a satisfactorily correlation validating the dataset.

### 2.3. Positive Matrix Factorization results

Source apportionment studies of atmospheric particulate matter are frequently performed using receptor models, based on the detailed chemical characterization of airborne particles collected at a receptor site (Paatero and Tapper, 1994). In this case, we used the US-EPA PMF5.0 model on the winter samples PM<sub>2.5</sub> dataset containing 58 individual samples. Uncertainties are critical to the output model results (Belis et al., 2015) and they were estimated following the Waked et al. (2014) procedure.

The variables were classified using the Signal-to-Noise (S/N) criteria (Paatero and Hopke, 2003). The database included 23 variables such as metals, water soluble ions and organic compounds (As, Ba, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Rb, Sb, Sr, Zn, Bi, V, Fe, OC, EC, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PAHs). The 17 PAHs measured were included in a single variable as there were all strongly correlated. PM<sub>2.5</sub> was set as a total variable and V was categorized as weak. Several species presenting too many data close or below the detection limit were eliminated from the database.

A model with 7 factors was retained, getting ratios of:

$$Q(\text{true})/Q(\text{robust}) = 1.18 \text{ and } Q(\text{true})/Q(\text{expected}) = 9.76$$

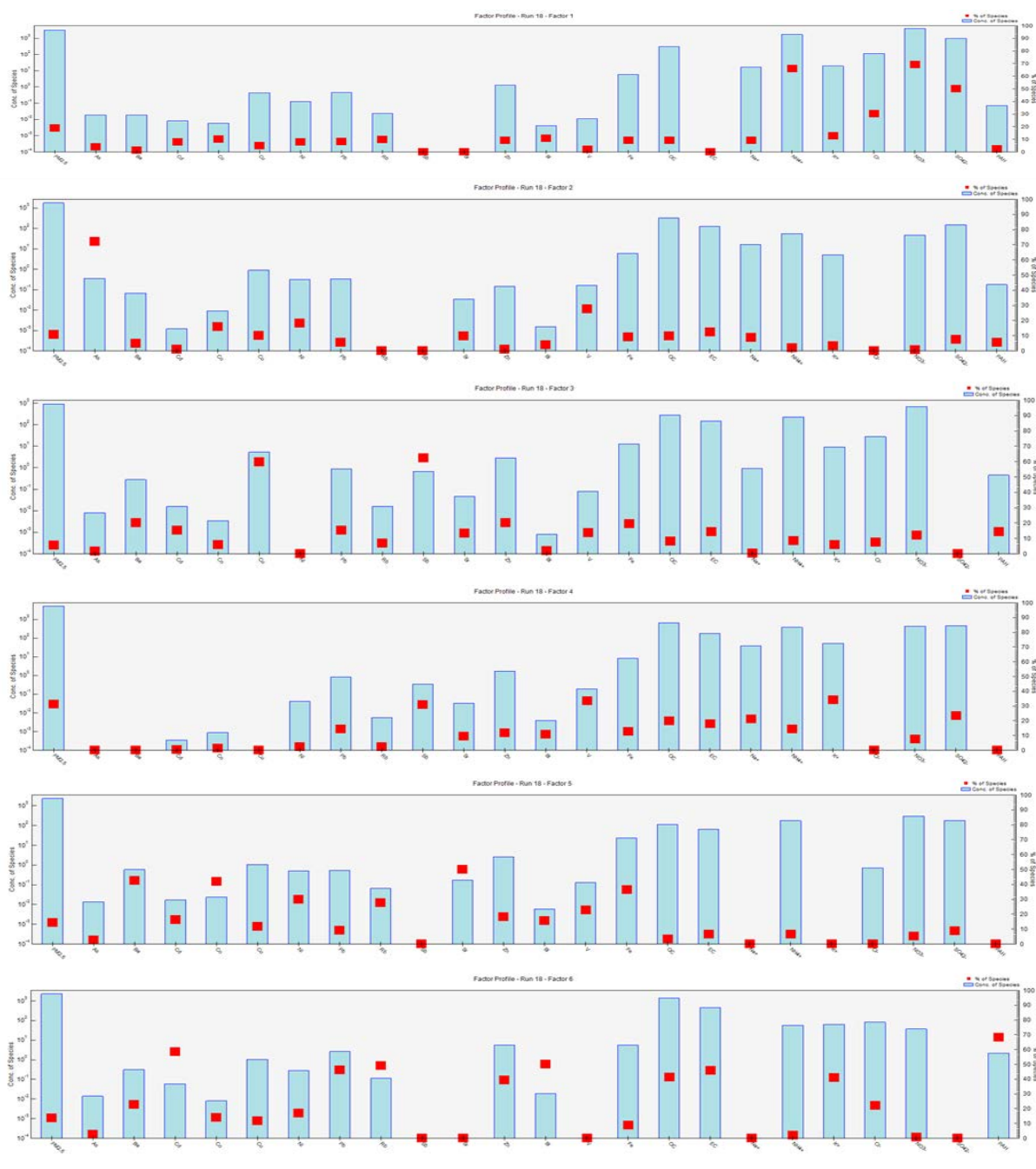
The Q ratios, bootstrap (Table 1) and DISP results (not shown) suggest a good PMF modeling. Based on the chemical profiles (Fig. 2), each factor is attributed to a given type of sources (Table 2).

Table 1

Bootstrap results for the 7 factors solution retained for the PMF modeling of the cold period.

Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Unmapped
100	0	0	0	0	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0
1	3	92	0	1	3	0	0
3	4	2	80	1	8	1	1
4	2	1	0	85	8	0	0
0	0	0	0	0	100	0	0
0	0	0	0	0	1	99	0

#### 2.4. Chemical profile of the contributions of the 7 factors



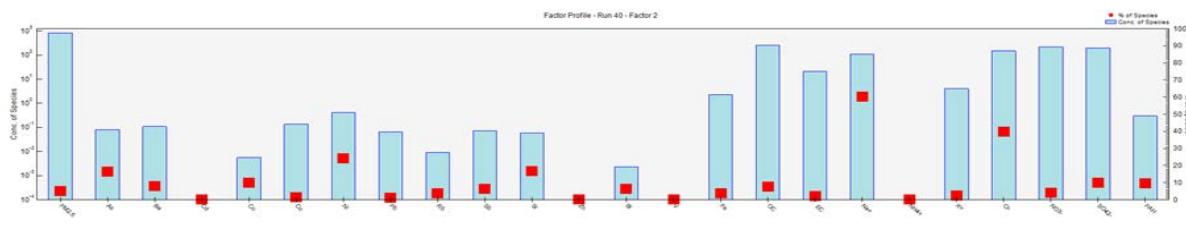


Fig. 1. Chemical profile (top) and time variability of contributions (bottom) of factor 1 (Secondary aerosols), factor 2 (Aged marine / heavy fuel combustion), factor 3 (road traffic), factor 4 (biomass burning), factor 5 (crustal matter), factor 6 (Coal combustion / non ferrous metals smelting), factor 7 (Fresh marine).

Table 2

Main characteristics of the 7 sources impacting the region.

Source	Main tracers	Mass fraction of PM2.5 (%)
Secondary aerosols	NH4+, NO3-, SO42-	19
Aged marine with heavy fuel combustion	As, Co, Ni, Sr, V, Na+ (no Cl-)	10.7
Road traffic	Cu, Sb	5.6
Combustion including biomass burning	K+, SO42-, EC, OC	31.4
Crustal matter with possible contribution of heavy fuel combustion from road works	Ba, Co, Ni, Rb, Sr, V, Fe	14.4
Coal combustion / non ferrous metals smelting	Cd, Pb, Rb, Bi, Zn, EC, OC, Cl-, PAH	13.9
Fresh marine	Na+, Cl-	5

## 2.5. Non parametric wind regression

The identification of the different sources is confirmed by their possible location (Fig. 17), according to their corresponding non parametric wind regression polar plots, calculated by Zefir (courtesy from J.E. Petit):

- Secondary aerosols come mainly from N and NE, as commonly observed in northwestern Europe (Fig. 2a);
- Aged marine aerosols come from the W and NW, in accordance with the direction of the Channel and North Sea (Fig. 2a);
- Road traffic aerosols come from the East of the receptor site, where a highway is situated (Fig. 2c);
- Biomass burning corresponds mainly to local sources surrounding the receptor site (heating of nearby buildings) (Fig. 2d);
- Crustal matter comes mainly from the south of the receptor site, where important works were carried out during the cold period (Fig. 2e);
- Aerosols from coal combustion / non ferrous metal activity are mainly emitted locally, from nearby sources (Fig. 2f);
- Fresh marine sea salt come also from the W and NW sectors (as aged marine aerosols) but for higher wind speeds, thus explaining why these aerosols are still “fresh” (transportation being too short for aging) (Fig. 2g).

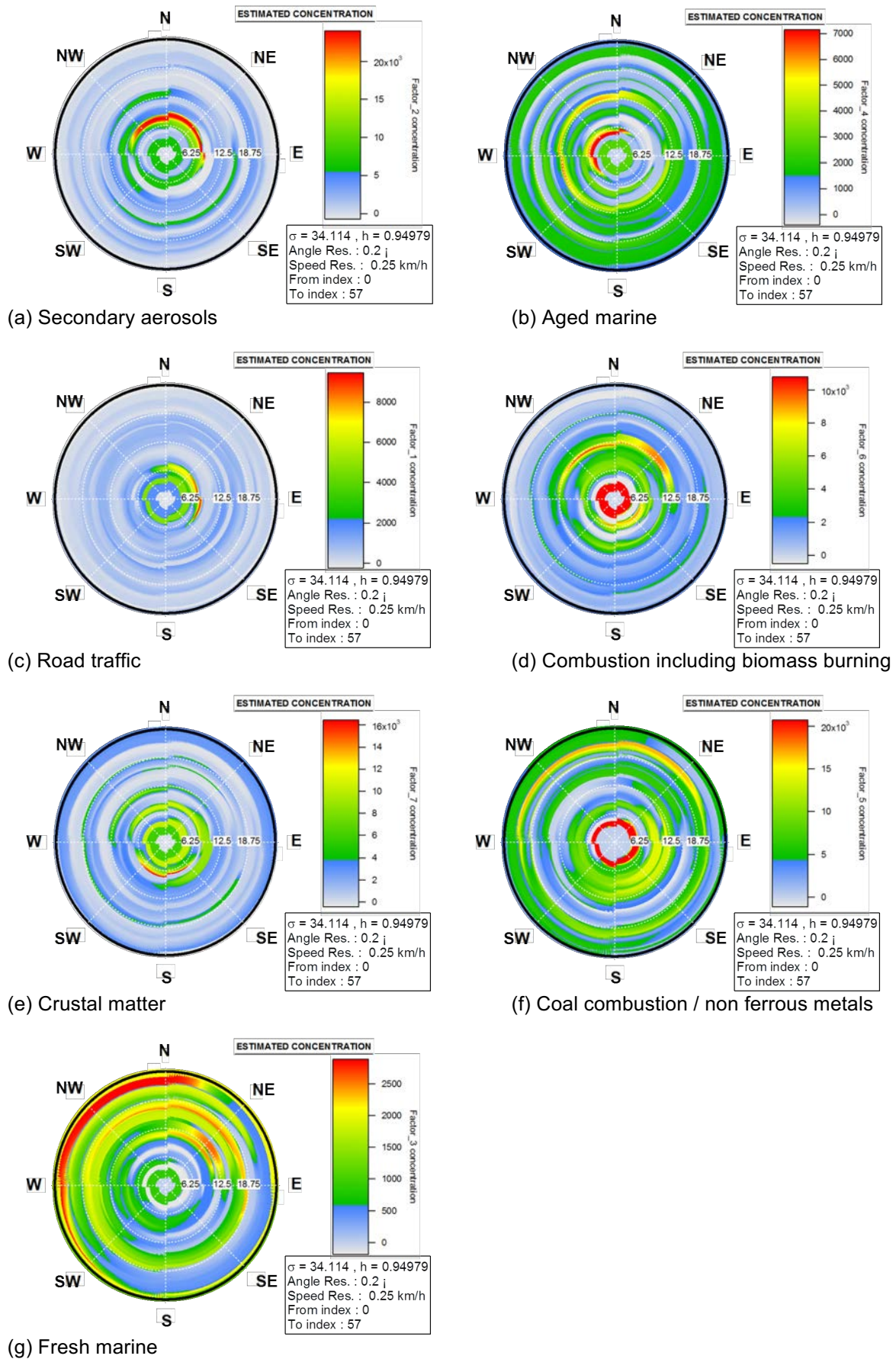


Fig. 2. Non parametric wind regression polar plots for the 7 sources.

To conclude, the PM<sub>2.5</sub> sample collected during the cold period results from the mixture of mainly seven sources, the majority (50.9%) coming from anthropogenic sources related to combustion processes from road traffic, biomass burning and coal combustion among others.

#### References:

- [1] L.Y. Alleman L. Y., L. Lamaison, E. Perdrix, A. Robache, J.-C. Galloo, PM<sub>10</sub> metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone, *Atmos. Res.* 96 (2010) 612-625.
- [2] S. Mbengue, L.Y. Alleman, P. Flament, Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmos. Res.* 135 (2014) 35-47.
- [3] M.E. Birch, R.A. Cary, Elemental carbon based method for monitoring occupational exposure to particulate 5 diesel exhaust, *Aer. Sci. and Technol.* 25 (1996) 221–241.
- [4] L. Chiappini, S. Verlhac, R. Aujay, W. Maenhaut, J. P. Putaud, J. Sciare, J. L. Jaffrezo, C. Liousse, C. Galy-Lacaux, L. Y. Alleman, P. Panteliadis, E. Leoz, and O. Favez, Clues for a standardised thermal-optical protocol for the assessment of organic and elemental carbon within ambient air particulate matter *Atmos. Meas. Tech.* (2014) 1649–1661.
- [5] J.J. Schauer, B.T. Mader, J.T. Deminter, G. Heidemann, M.S. Bae, J.H. Seinfeld, T. Flagan, R. C., Cary, R. A., Smith, D., Huebert, B. J., Bertram, T., Howell, S., Kline, J. T., Quinn, P., Bates, B. Turpin, H.J. Lim, J.Z. Yu, H. Yang, M.D. Keywood, ACE-Asia intercomparison of a thermal-optical method for the determination of particle-phase organic and 10 elemental carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 993–1001.
- [6] Crenn, in press
- [7] P. Paatero, Least squares formulation of robust non-negative factor analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 37 (1997) 23-35.
- [8] P. Paatero, U. Tapper, Positive matrix factorization: a non-negative factor model with optimal utilization of error estimates of data values. *Environmetrics*, 5 (1994) 111-126.
- [9] C.A. Belis, D. Pernigotti, F. Karagulian, G. Pirovano, B.R. Larsen, M. Gerboles, P.K. Hopke, A new methodology to Assess the Performance and Uncertainty of Source Apportionment Models. *Atmos. Environ.* (2015) 119, 35-44.
- [10] A. Waked, O. Favez, L. Y. Alleman, C. Piot, J.-E. Petit, T. Delaunay, E. Verlinden, B. Golly, J.-L. Besombes, J.-L. Jaffrezo, and E. Leoz-Garziandia, Source apportionment of PM<sub>10</sub> in a north-western Europe regional urban background site (Lens, France) using positive matrix factorization and including primary biogenic emissions, *Atmos. Chem. Phys.* (2014) 3325–3346.
- [11] P. Paatero, P.K. Hopke, Discarding or downweighting high-noise variables in factor analytic models. *Analytica Chimica Acta* 490 (2003) 277-289.

#### **4. Article 4 : Mitochondrial disorders in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM2.5**

**Auteurs :** B Leclercq, J Kluza, S Antherieu, L.Y Alleman, P Coddeville, J.M Lo Guidice, P Marchetti and G Garçon.

Cet article est actuellement en cours de finalisation.

#### **Contexte et résultats de l'étude**

L'exposition aux particules atmosphériques (PM) est associée à l'augmentation de la prévalence de nombreuses pathologies dont la BPCO ou les cancers pulmonaires (Beelen et al., 2013 ; Hamra et al., 2014 ; Pope, 2014 ; Jerrett et al., 2016 ; Raaschou-Nielsen et al., 2016). Le manque de connaissances quant aux effets exercés par les PM sur la santé est lié en partie à leur composition variable et nécessite des études *in vitro* plus poussées et ce dans des modèles cellulaires pertinents. Le stress oxydatif et l'inflammation sont les mécanismes reconnus comme étant fortement impliqués dans la pathogenèse induite par les PM (Longhin et al., 2016). Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux dommages mitochondriaux induits par les particules. De nombreux stress extérieurs peuvent affecter l'activité des mitochondries en perturbant l'homéostasie mitochondriale, le système redox, la phosphorylation oxydative ou encore la biogenèse et la mitophagie (Lerner et al, 2016). Les modifications des fonctions mitochondriales induites par les différents facteurs extérieurs sont associées à une augmentation de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et de l'inflammation. De plus, l'augmentation de la sécrétion d'ERO mitochondriaux, d'ATP extracellulaire et la libération d'ADN mitochondriaux provoque des réactions inflammatoires qui à leur tour aggravent les dysfonctions mitochondriales (Yue and Yao, 2016). La production d'ERO est impliquée dans divers mécanismes cellulaires physiologiques mais également dans la mise en place de nombreuses pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques ou les cancers (Cha and Kleeberger., 2015 ; Hölmstrom et al, 2016). Le facteur de transcription, *nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2* (Nrf2) joue un rôle clé dans le maintien de la balance redox cellulaire et surtout pour réguler la production d'ERO mitochondriaux (mtERO) (Yue and Yao,

2016). Dans les cancers, de nombreuses dysfonctions mitochondriales dont des altérations métaboliques sont observées (Vyias et al, 2016). En effet, en conditions anaérobiques, le pyruvate formé va être préférentiellement transformé en lactate qui va sortir de la cellule cancéreuse et venir acidifier le milieu extracellulaire. Dans de nombreux cancers, les cellules voient leur métabolisme énergétique modifié et vont privilégier la voie glycolytique, en présence ou absence d'oxygène, au détriment de la phosphorylation oxydative, c'est l'effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009). Cependant, il est montré que certaines cellules cancéreuses peuvent produire leur ATP par la voie glycolytique (effet Warburg) mais également que d'autres cellules le produisent par la phosphorylation oxydative (Coller., 2014).

Dans le but de mieux étudier les atteintes mitochondriales, des cellules BEAS2B ont été exposées aux PM<sub>2.5</sub> issues des 2 saisons PE et AH. Les doses de 2 et 10 µg de PM<sub>2.5</sub> ont été utilisées car elles ne présentent pas de cytotoxicité. Une augmentation significative de la 8OHdG, de la 8-isoprostane, de la liaison de Nrf2 sur l'ADN et de la SOD est observée dans les BEAS2B, de manière dose et exposition dépendantes et ce de manière plus importante pour les PM AH. L'augmentation de l'Hydroéthidine (HE) dans les BEAS2B exposées aux PM<sub>2.5</sub> montre une augmentation dose et exposition dépendantes des ERO et cette augmentation est également observée pour les mtERO. Des images réalisées à l'aide d'un microscope électronique en transmission (MET) montrent que les particules pénètrent bien dans les cellules et se retrouvent dans leur cytoplasme. Nous avons observé des différences dans la morphologie des mitochondries des cellules exposées aux PM<sub>2.5</sub> avec un volume plus important, une matrice plus claire et la présence moins importante de cristaux. Une diminution de la capacité respiratoire des BEAS2B est observée suite au traitement par les particules AH uniquement, de même que la concentration d'ATP qui est diminuée dans ces cellules traitées aux PM AH. Certains paramètres ont également été mesurés dans les cellules NHBE saines et BPCO, tout d'abord, par la microscopie photonique et la MET, nous avons montré que les cellules sont toujours adhérentes et différenciées après exposition aux PM<sub>2.5</sub> et avons détecté la présence des particules dans les cellules. Les capacités respiratoires des cellules BPCO sont moins importantes que celles des CEBH saines. De la même manière que pour les BEAS2B, les NHBE saines et BPCO présentent une diminution de leurs capacités respiratoires et de leur concentration d'ATP suite à l'exposition la plus forte par les particules AH.

## Discussion et perspectives de l'article

Le but de cette étude est d'évaluer le rôle que jouent les mitochondries dans le stress oxydatif induit par les  $PM_{2.5}$ . Pour cela nous avons non seulement utilisé la lignée cellulaire BEAS2B pour étudier cet effet mais confirmé les résultats obtenus dans les CEBH saines et surtout dans les CEBH BPCO. Encore une fois nous avons montré l'importance d'intégrer le modèle BPCO dans cette étude puisque ces cellules sont plus sensibles à l'exposition aux  $PM_{2.5}$  et présentent un stress oxydatif exacerbé (Leclercq et al., 2016) mais également un dysfonctionnement mitochondrial. Les cellules BEAS2B, exposées aux  $PM_{2.5}$  prélevées à Lille au cours des saisons AH et PE, vont présenter un stress oxydatif important, avec une augmentation significative de la 8OHdG, de la 8-isoprostane, de la liaison de Nrf2 sur l'ADN et de la SOD, ce de manière exposition-dépendante et avec des effets plus importants induits par le prélèvement AH. Cette différence d'effet induit par le prélèvement AH peut s'expliquer par des variabilités de composition entre les particules AH et PE. En effet, les  $PM_{2.5}$  AH contiennent une concentration plus importante en métaux (i.e., 207 versus 160 $\mu$ g/g), en HAPs (i.e., 69.4 versus 25.4 $\mu$ g/g), en PCDD/Fs (i.e.,  $\Sigma$ PCDDs: 13.9 versus 11.5 $\mu$ g/g,  $\Sigma$ PCDFs: 6.37 versus 4.45 $\mu$ g/g), et en DL- et M-PCBs ( $\Sigma$ DL-PCBs: 44.5 versus 24.3 $\mu$ g/g, and  $\Sigma$ M-PCBs: 233 versus 158 $\mu$ g/g). L'effet pro-oxydant peut-être lié à la présence de certains métaux (Al, Cr, Cu, Fe, Mn, and Zn) ou de certains éléments organiques dont les HAPs (Leclercq et al., 2016). Des ERO sont mesurées dans les cellules BEAS2B et de manière plus précise de mtERO sont produits suite à l'exposition aux  $PM_{2.5}$ . L'exposition aux  $PM_{2.5}$  semble entraîner des modifications morphologiques des mitochondries qui même si elles gardent leur intégrité membranaire, présentent un volume plus important, une matrice plus claire et la présence moins importante de cristaux. En parallèle de cela, une diminution de la respiration mitochondriale ou phosphorylation oxydative a été mesurée dans les cellules BEAS2B exposées de manière réitérée à la plus forte concentration de  $PM_{2.5}$  AH. Nous avons validé certains paramètres dans un modèle plus relevant que sont les cultures primaires de CEBH issues de personnes saines et de patients atteints de BPCO. Nous montrons que les cellules, une fois traitées de manière réitérée aux particules, conservent leur structure 3D et leur état de différenciation. De plus, les  $PM_{2.5}$  sont retrouvées présentes dans le cytoplasme des CEBH saines et BPCO. Au cours de nos précédentes études, nous avons montré que les  $PM_4$  et  $PM_{2.5}$  induisent une inflammation et un stress oxydatif avec des atteintes sur les macromolécules (ADN, lipides, protéines) et ce de manière plus prononcée pour les cellules BPCO. De la même manière que pour les cellules



BEAS2B, les CEBH vont présenter une diminution de la respiration mitochondriale et ce pour les particules AH à la plus forte concentration avec un effet plus marqué dans les cellules BPCO.

Il est montré que certaines tumeurs vont favoriser la conversion du glucose en lactate et ce en présence ou non d'oxygène, c'est l'effet Warburg ou la glycolyse aérobie. Ces cellules tumorales vont, pour certaines d'entre-elles, défavoriser la phosphorylation oxydative au profit de la glycolyse. Les cellules tumorales vont de manière générale favoriser la production d'ERO qui sont capables d'induire des dommages à l'ADN, aux protéines ou aux lipides. De plus, elles vont présenter un dysfonctionnement mitochondrial lié à la production importante de mtERO. Il est montré, que la production de ces mtERO peut agir de manière positive sur les voies de signalisation favorisant la croissance cellulaire. L'augmentation des ERO est commune à de nombreux cancers, Nrf2 joue un rôle important dans le contrôle du niveau d'ERO dans les cellules cancéreuses pour en maintenir une certaine forme d'homéostasie (DeNicola et al., 2011). Les cellules cancéreuses vont de plus présenter une hypoxie liée à la prolifération active des cellules avec une néoangiogenèse peu efficace défavorisant les apports en oxygène et nutriments des cellules. Un facteur important impliqué dans la mise en place de cet hypoxie est HIF-1 $\alpha$  qui permet à la tumeur de s'adapter à cet environnement pauvre en oxygène (Semenza., 2012). Par conséquent, les différentes dérégulations couramment observées dans les différents cancers sont également retrouvées à la fois dans les cellules BEAS2B et CEBH saines et BPCO exposées aux PM<sub>2.5</sub>. Ce travail démontre, l'importance du rôle que joue la mitochondrie dans la mise en place du stress oxydatif induit par les particules. En effet, les PM<sub>2.5</sub> induisent la production d'ERO mitochondriales et diminuent la phosphorylation oxydative. Il serait intéressant de voir l'état de la respiration mitochondriale sur des expositions à plus long terme et d'aller mesurer des facteurs de l'hypoxie dont HIF-1 $\alpha$ . De plus, ce travail montre l'importance d'évaluer la composition chimique des particules et de prendre en compte ce paramètre dans les études toxicologiques puisque selon la saison de prélèvement les effets induits peuvent être différents. Nous pouvons donc imaginer les différences qui peuvent être observées pour des études toxicologiques comparant des particules rurales, urbaines ou industrielles.

# MITOCHONDRIAL DISORDERS IN HEALTHY AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASED HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS REPEATEDLY EXPOSED TO AIR POLLUTION-DERIVED PM<sub>2.5</sub>

LECLERCQ B<sup>1,2</sup>, KLUZA J<sup>3</sup>, ANThERIEU S<sup>1</sup>, ALLEMAN LY<sup>2</sup>, LOYENS A<sup>4</sup>, CODDEVILLE P<sup>2</sup>, LO GUIDICE J-M<sup>1</sup>, MARCHETTI P<sup>3</sup>, GARÇON G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, FRANCE

<sup>2</sup> Mines de Douai, SAGE, CS10838, F-59508 Douai, FRANCE

<sup>3</sup> Univ. Lille, UMR-S 1172 - JPArc Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France.

<sup>4</sup> Inserm, UMR-S 1172, F-59000 Lille, France.

**Corresponding Author :** Pr Guillaume GARÇON, EA4483, Département de Toxicologie, Santé publique et Environnement, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, 3 rue du Professeur Laguesse, BP83 59006 Lille Cedex, France. Tél: +33-362283030; E-mail: guillaume.garcon@univ-lille2.fr

## ABSTRACT

Air pollution-derived particulate matter (PM) is nowadays considered one of the major environmental risks to health worldwide. Although oxidative stress and inflammation have been reported as the main PM-induced cell outcomes, several aspects concerning the underlying mechanisms responsible for PM-induced harmful health effects remain unclear. Hence, to better elucidate whether mitochondrial disorders will be closely related to cell homeostasis maintenance, human bronchial epithelial BEAS-2B cells repeatedly exposed to low doses (i.e., 2 and 10 µg:cm<sup>2</sup>) of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>, collected during two contrasted seasons (i.e., spring-summer, SS, and autumn-winter, AW) were firstly used. After having checked the relatively low cytotoxicity, oxidative and mitochondrial endpoints were studied through the determination of DNA damage (i.e., 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine), lipid peroxidation (i.e., 8-isoprostane), cell redox homeostasis (i.e., nuclear factor erythroid 2-p45 related factor 2), antioxidant enzyme activity (i.e., superoxide dismutase), and mitochondrial oxidative metabolism (i.e., morphological observations; oxidative phosphorylation, OXPHOS; production of mitochondrial reactive oxygen species, mtROS; and ATP turnover). The ROS-related mitochondrial disorders occurring in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>, which contains the highest concentrations of some well-known harmful chemicals, were in line with those which could appeared in cancer cells. To go even farther in this work by validating such PM-induced mitochondrial disorders in more relevant lung cell systems, normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, with the cells being grown at the air-liquid interface, were repeatedly exposed to the SS and AW PM<sub>2.5</sub> samples. Results are consistent with a reduction of the OXPHOS possibly relying on the local production of mtROS in healthy and with more considerable effects in COPD-diseased cells, repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>. Taken together, these results supported for the first time the reduction of the mitochondria OXPHOS as a crucial underlying mechanism closely involved in the toxicity induced by repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> in NHBE and particularly sensitive COPD NHBE cells.

**KEYWORDS:** Air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>; human bronchial epithelial cells; healthy and COPD phenotypes; mitochondrial disorders

## INTRODUCTION

Air pollution is now a well-established risk factor for the development and worsening of diseases such as cancers (Beelen et al., 2013; Hamra et al., 2014; Jerrett et al., 2016; Pope, 2014; Raaschou-Nielsen et al., 2016). Indeed, air pollution exposure has been extensively linked to respiratory-related morbidity, particularly with airways diseases, and is notably associated with asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) incidence and/or exacerbation (Johansson et al., 2016). To et al. (2016) reported that individuals exposed to higher levels of air pollution had nearly 3-fold greater odds of developing asthma and COPD overlap syndrome. In 2012, 7 million people, which represent one in eight of total global premature deaths worldwide, died as a result of air pollution exposure, and 3.7 million premature deaths around the world were specifically attributed to air pollution-derived particulate matter (PM) exposure (WHO, 2014). In 2013, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified outdoor air pollution and notably air pollution-derived particulate matter (PM) as cancer-causing agents (IARC, 2015). However, PM is a complex mixture of particles, originating from a myriad of natural and anthropogenic sources, whose chemical composition varies over space and time, showing the diversity of sources and the effect of atmospheric processes (Loomis et al., 2013). The current lack of knowledge of the causal relation between PM inhalation and human diseases can be attributed to the heterogeneity of PM chemical composition.

The possibility to uncover some new underlying mechanisms by which air pollution-derived PM exerts its harmful health effects also requires the use of detailed *in vitro* studies on relevant lung cell systems in support of classical approaches. Novel tissue-engineering tools have recently emerged to help in recapturing the native lung environment *ex vivo*. These innovative *in vitro* models integrate a number of factors related to pre-existing chronic lung inflammation and allow to obtain a differentiation state, as close as possible, to the cell exposure conditions reported *in vivo*. Aiming of getting closer to the human *in vivo* conditions, primary culture models of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, with the cells being grown at the air-liquid interface (ALI), are now available (Leclercq et al., 2016).

Oxidative stress, inflammation and genetic damages are generally considered as the main PM-induced cell outcomes (Longhin et al., 2016). As argued by other authors, we have gradually supported that, after single short-term exposure of lung cells to air pollution-derived PM, such underlying mechanisms are closely involved in PM-induced harmful cell effects (Abbas et al., 2009; 2010, 2013, 2016; André et al., 2010; Billet et al., 2007, 2008; Dagher et al., 2005, 2006, 2007; Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Lepers et al., 2014; Saint-Georges et al., 2008, 2009). However, to date, only very few distinct authors supported mitochondrial disorders as one of the underlying mechanisms closely involved in the PM-induced cell outcomes (Aggarwal et al., 2016; Ferecatu et al. 2010; Gualtieri et al. 2011). Indeed, myriad forms of external stress could disrupt mitochondrial function by impacting critical processes in mitochondrial homeostasis, such as mitochondrial redox system, oxidative phosphorylation, biogenesis, and mitophagy (Lerner et al., 2016). External factors that interfere with the steady state activity of mitochondrial functions are generally associated with an increase in reactive oxygen species (ROS) and inflammatory response, via mitochondrial damage associated molecular patterns. Lerner et al (2016) recently highlighted the primary mitochondrial quality control mechanisms that are influenced by oxidative stress/redox system, including the role of mitochondria during inflammation and cellular senescence, and how mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of COPD and its exacerbations. Emerging evidence also supports that increased mitochondrial ROS generation, extracellular ATP, and mitochondrial DNA release cause inflammatory responses, which, in turn, aggravate mitochondrial dysfunction (Yue and Yao, 2016). However, the understanding of the role of ROS within the cell is becoming increasingly complex. The traditional view of ROS simply being a harmful by-product of respiration is giving way to a more intricate picture where the role of ROS as an important signaling molecule is emerging (Hölmstrom et al., 2016). It is however becoming evident that an imbalance in the generation of ROS is a common feature in several disease states, including chronic inflammatory lung diseases and cancers (Cha and Kleeberger, 2015). Hence, as the master regulator of the cellular redox homeostasis, the nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) is well equipped to counterbalance the mitochondrial ROS (mtROS) production and is critical for maintaining the redox balance in the cell (Yue and Yao, 2016). Moreover, mitochondrial dysfunction, including metabolic alterations, has been observed in cancer cells (Vyias et al., 2016). For instance, many tumour cells exhibit excessive glucose conversion to lactate even with oxygen, as well as concomitantly defective mitochondrial respiration, a phenomenon known as aerobic glycolysis or Warburg effect. The Warburg effect demonstrates that mitochondria are producing ATP through glycolysis (Roberts and Thomas, 2013). However, in cancer cells, some cell lines produce ATP through oxidative phosphorylation and some other, consistent with Warburg effect, through glycolysis (Coller et al., 2014).

To better elucidate whether mitochondrial disorders will be closely related to cell PM exposures, human bronchial epithelial BEAS-2B cells repeatedly exposed to relatively low doses of air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>, collected during two contrasted seasons (i.e., spring-summer, SS, and autumn-winter, AW) were firstly used. After having checked the cytotoxicity, oxidative and mitochondrial endpoints were studied through the determination of

DNA damage (i.e., production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG), lipid peroxidation (i.e., production of 8-isoprostane), cell redox homeostasis (i.e., nuclear factor erythroid 2-p45 related factor 2, Nrf2), antioxidant enzyme activity (i.e., superoxide dismutase, SOD), and mitochondrial oxidative metabolism (i.e., morphological observations, oxidative phosphorylation, ROS production, and ATP turnover). Mitochondrial disorders were thereafter validated in more relevant lung cell systems, such as primary culture models of NHBE and highly sensitive COPD-DHBE cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **REAGENTS**

All the culture reagents for BEAS-2B and HBE cells were provided by Thermo-Scientific (Illkirch, France) and LONZA (Verviers, Belgium), respectively. Vybrant Cytotoxicity Assay Kit and MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator was from Thermo-Scientific, and CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability from Promega (Charbonnière-les-Bains, France). QIAamp DNA Mini Kit was from Qiagen (Courtaboeuf, France). Highly Sensitive 8-OHdG Check kit was from Gentaur France SARL (Paris, France) and 8-isoprostane ELISA kit from Abcam (Cambridge, UK). Nuclear extract and TransAM® Nrf2 kits were from Active Motif (La Hulpe, Belgium). SOD determination kit and other chemical reagents were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### **METHODS**

#### **4.1 Field campaign, sampling description, and physicochemical characterization of PM<sub>2.5</sub>**

All the methods for the sampling of the two PM<sub>2.5</sub> samples and their physicochemical characterization have been published elsewhere (Leclercq et al., 2016). Briefly, air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> samples were collected during two distinct seasons (i.e., SS and AW) in the center of Lille (France). Size distribution and chemical constituents (e.g., metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs; polychlorinated dibenzo-p-dioxin and furans, PCDD/Fs; dioxin-like and marker polychlorinated biphenyls, DL- and M-PCBs) were analysed.

#### **Cell culture and PM<sub>2.5</sub>-exposure**

BEAS-2B cell line was from European Collection of Cell Cultures (ECACC, Wiltshire, UK; reference: 95102433), and originally derived from normal bronchial epithelial human cells obtained from autopsy of non-cancerous individuals. NHBE and COPD-DHBE cells (LONZA) were established from biopsies isolated from five healthy and five COPD-diseased donors, respectively. The characteristics of the donors and their HBE cells are shown in Table 1; except for the smoking habits, no significant difference was reported between the characteristics of the healthy and COPD-diseased status. Cell culture methods of BEAS-2B cells (i.e., also grown submerged) and HBE cells (i.e., also grown at ALI) have been published elsewhere (Dergham et al., 2012, 2015; Leclercq et al., 2016). Briefly, BEAS-2B cells, on the one hand, and NHBE and COPD-DHBE cells, on the other hand, were exposed one or three times, for 4h, at 24h intervals, to controls (i.e., sterile HBSS, 500µL) or SS and AW PM<sub>2.5</sub>exposed cells (i.e., concentrations ranging from 1 to 20µg PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup>, suspended in sterile HBSS, 500µL).

#### **Transmission electron microscopy (TEM) observations**

Twenty-four hours later, BEAS-2B, NHBE and COPD-DHBE cells were fixed with paraformaldehyde (2% v/v)-glutaraldéhyde (2% v/v) in phosphate-buffered solution (PBS). After a post-fixation with osmium tetroxide (1% v/v) in PBS, cells were progressively dehydrated in graded alcohols (50, 70, 80, 95, and 100%) and embedded in an Epon/ethanol mixture thereafter in Epon. After total polymerization, 85nm sections cut and stained with uranyl acetate (2% v/v in ethanol) and Reynolds lead citrate prior their observations in TEM (Zeiss EM900, Carl Zeiss SAS, Marly le Roi, France).

#### **Toxicological endpoints**

Twenty-four hours later, cytotoxicity in BEAS-2B, NHBE and COPD-DHBE cells was studied by the extracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity (Vybrant Cytotoxicity Assay Kit) in cell-free culture media. 8-OHdG and 8-isoprostane concentrations were carried out by commercially available enzyme immunoassays (Highly Sensitive 8-OHdG Check and 8-isoprostane ELISA kits, respectively), as published elsewhere (Dergham et al., 2015). Nrf2 binding activity was evaluated by the TransAM® Nrf2 kit. SOD activity (SOD determination kit) was performed as detailed by Kouassi et al. (2010). ROS detection was achieved by two oxidation sensitive fluorescent probes, hydroethidine (HE) and mitochondria-targeted HE (MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator), following classical protocols (Carazao-Rosas et al., 2013). Oxygen consumption rate (OCR) was studied using the Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience,

Billerica, MA, USA) after the sequential addition of oligomycin (i.e., oli, 1 $\mu$ M), 2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile (FCCP; 0.25-0.5 $\mu$ M), rotenone (i.e., rot, 1 $\mu$ M), and antimycin A (i.e., AA, 1 $\mu$ M), as published by Carzao-Rosas et al. (2013). ATP concentration was studied in cells using CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability kits.

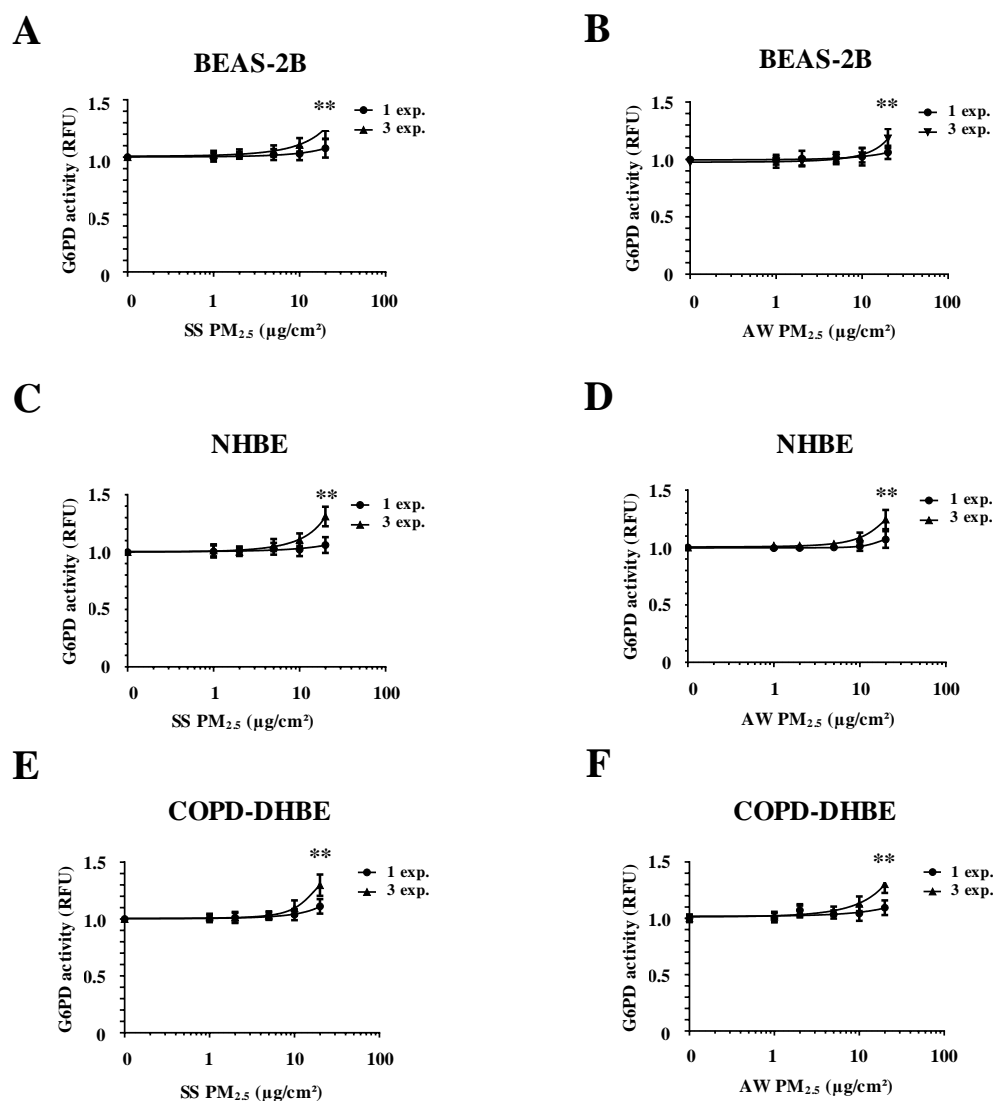
### Statistical analysis

Cytotoxicity data were analyzed with GraphPad Prism6 Software (v6.01) (GraphPadSoftware Inc., USA). For the other toxicological endpoints, BEAS-2B, NHBE and COPD-DHBE cells exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> were compared with those from controls using the Mann-Whitney U-test, with *p* value correction for multiple comparisons. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Software (v20) (IBM SPSS Software, Inc., USA). Statistically significant differences were reported with *p* values <0.05.

## RESULTS

### Cytotoxicity in PM<sub>2.5</sub>-exposed BEAS-2B, NHBE and COPD-DHBE cells

Significant increases of G6PD activity were reported only after the repeated exposure of BEAS-2B, NHBE and COPD-DHBE cells to SS and AW PM<sub>2.5</sub> at their highest concentrations (i.e., 20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>; *p*<0.01) (Figure 1). There was no difference between the cytotoxicity within the three cell models. Hence, these results supported the use of 2 and 10 $\mu$ g PM<sub>2.5</sub>/cm<sup>2</sup> as non-cytotoxic doses to study mitochondrial disorders.



**Figure 1:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) release in cell-free culture media of human bronchial epithelial BEAS-2B cells (Figures 1A-B), grown submerged, and normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, grown and

thereafter differentiated for 21 days at air-liquid interface (Figures 1C-D, and 1E-F, respectively). G6PD activity was measured 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to increasing concentrations (i.e., ranging from 1 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during spring-summer (SS) and autumn-winter (AW) seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n = 6). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus BEAS-2B, NHBE or COPD-DHBE controls: \*\*: *p*<0.01).

#### Mitochondrial disorders in PM<sub>2.5</sub>-exposed BEAS-2B cells

Dose- and exposure-dependent changes of 8-OHdG and 8-isoprostane concentrations were reported in BEAS-2B cells (*p*<0.05) (Table 2). The Nrf2 binding activity was significantly increased after one exposure to the highest dose or three exposures to the lowest dose of SS PM<sub>2.5</sub> and particularly AW PM<sub>2.5</sub> (*p*<0.01). Interestingly, while a slight increase of Nrf2 binding activity was reported in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of SS PM<sub>2.5</sub>, in contrast, there was a significant decrease after three exposures to AW PM<sub>2.5</sub> at its highest dose (*p*<0.05). Overall, similar changes of SOD activity were reported.

**Table 1: Characteristics of the healthy and COPD-subjects and their HBE cells**

Variable <sup>a</sup>	Healthy subjects	COPD subjects
Number (n)	5	5
Age (years) <sup>m</sup>	49.8 ± 11.8	54.8 ± 10.2
Sex <sup>m</sup>	3 males / 2 females	2 males / 3 females
Race <sup>k</sup>	5 Caucasians	5 Caucasians
Smoking habits <sup>k</sup>	5 non-smokers	5 smokers <sup>**</sup>
Alcohol use <sup>k</sup>	5 non-alcohol users	5 non-alcohol users
HBE cell passage <sup>k</sup>	1	1
HBE cell viability (%) <sup>m</sup>	81.4 ± 5	82.8 ± 5.2
HBE cell count (10 <sup>3</sup> /vial) <sup>m</sup>	801 ± 156	994 ± 161
HBE cell seeding efficiency (%) <sup>m</sup>	53 ± 9.7	58.4 ± 14.1
HBE cell doubling time (h) <sup>m</sup>	22.8 ± 4.3	28.2 ± 7.5

<sup>a</sup>: expressed either as number, or as mean value ± SD

<sup>m</sup> = Mann-Whitney U test

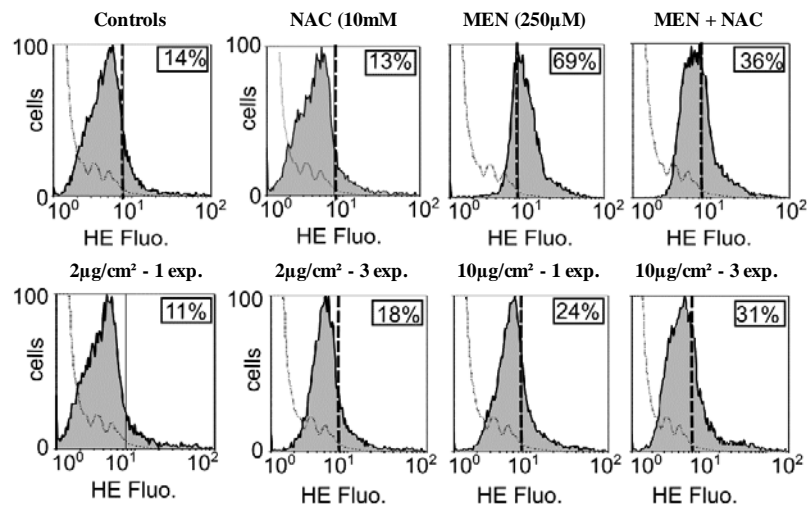
<sup>k</sup> = K $\chi^2$  test (\*\*: *p*<0.01)

**Table 2: Oxidative endpoints in BEAS-2B cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub>**

Season	Exposure (n)	[PM] ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Oxidative stress endpoints			
			8-OHdG (pg/ $\mu\text{g}$ DNA)	8-isoprostane (pg/mg protein)	Nrf2 (U <sub>Abs</sub> / $\mu\text{g}$ protein)	SOD (UI/mg protein)
Controls			3.30 ± 1.10	1.74 ± 0.34	1.40 ± 0.34	178 ± 35
SS	1	2	4.01 ± 1.20	1.70 ± 0.46	1.34 ± 0.44	208 ± 43
		10	<b>20.77 ± 4.73</b> **	<b>3.30 ± 0.68</b> **	<b>3.20 ± 0.74</b> **	<b>364 ± 62</b> **
	3	2	<b>14.69 ± 4.10</b> **	<b>2.55 ± 0.20</b> *	<b>2.13 ± 0.35</b> **	<b>248 ± 34</b> **
		10	<b>35.70 ± 7.17</b> **	<b>6.74 ± 2.44</b> **	<b>1.94 ± 0.34</b> **	<b>236 ± 26</b> **
AW	1	2	4.34 ± 1.14	1.94 ± 0.35	1.71 ± 0.40	220 ± 40
		10	<b>27.44 ± 4.40</b> **	<b>4.34 ± 0.80</b> **	<b>3.98 ± 0.78</b> **	<b>397 ± 75</b> **
	3	2	<b>17.49 ± 3.20</b> **	<b>2.86 ± 0.36</b> *	<b>2.90 ± 0.48</b> **	<b>276 ± 38</b> **
		10	<b>48.39 ± 9.37</b> **	<b>9.94 ± 3.04</b> **	<b>0.98 ± 0.30</b> *	170 ± 25

As shown in Figure 2, HE oxidation sensitive fluorescent probe revealed a dose- and exposure-dependent ROS production in BEAS-2B cells exposed to AW PM<sub>2.5</sub>. Mitochondria-targeted HE also supported this result and specifically indicated the production of mtROS.

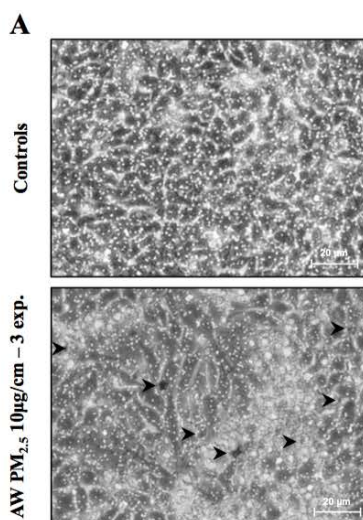
**Figure 2**

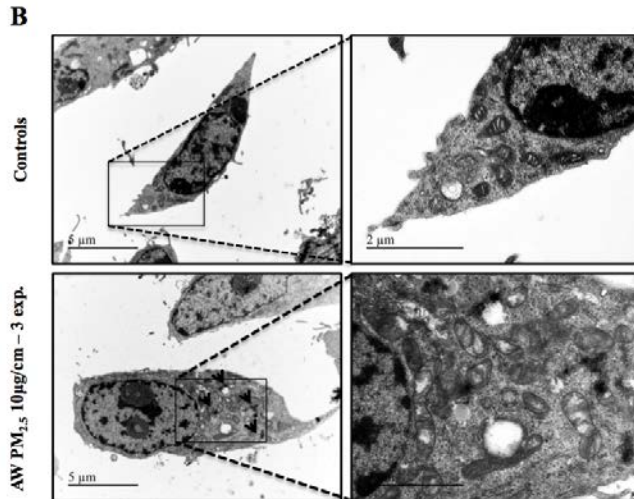


**Figure 2:** Reactive oxygen species (ROS) production using the hydroxyethidine (HE) oxidation sensitive fluorescent probe of human bronchial epithelial BEAS-2B cells, grown submerged, as negative controls or repeatedly exposed to 10µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the autumn-winter (AW) season. HE was measured using flow cytometry in BEAS-2B cells as negative controls or 24h after one or three 4h exposures with 24h intervals to 2 and 10µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the AW season. Values are depicted as the median of HE-derived fluorescence (i.e., n = 3; NAC: N-acetylcysteine; NEM: N-ethylmaleimide).

Photonic microscopy observations of BEAS-2B cells repeatedly exposed to AW PM<sub>2.5</sub> at its highest dose showed the presence of several particles (Figure 3A), whereas TEM observations confirmed their presence within the cytoplasm of repeatedly-exposed BEAS-2B cells (Figure 3B). Mitochondrial morphology differed in BEAS-2B cells repeatedly exposed to AW PM<sub>2.5</sub>: despite the apparent membrane integrity, there were higher volumes, clearer matrices, and lesser cristae.

**Figure 3**

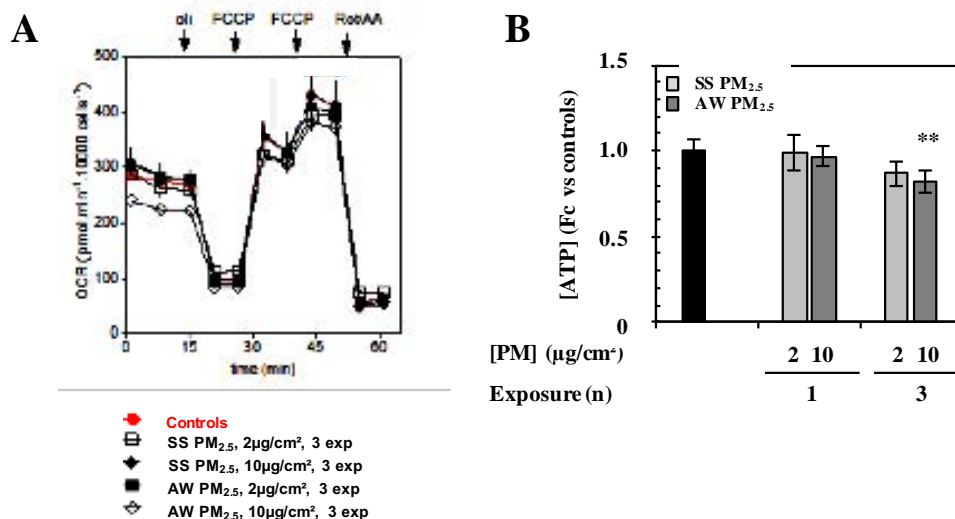




**Figure 3:** Observations of human bronchial epithelial BEAS-2B cells, grown submerged, as negative controls or repeatedly exposed to  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived  $\text{PM}_{2.5}$  collected during the autumn-winter (AW) season, using photonic microscopy (Figure 3A) and transmission electronic microscopy (TEM; Figure 3B). Photonic microscopy observations of BEAS-2B cells repeatedly exposed to AW  $\text{PM}_{2.5}$  at its highest dose showed the presence of several air pollution-derived PM (Figure 3A). Moreover, TEM observations confirmed the presence of these particles within the cytoplasm of repeatedly-exposed BEAS-2B cells (Figure 3B). Mitochondrial morphology differed in BEAS-2B cells repeatedly exposed to AW  $\text{PM}_{2.5}$ : despite the apparent membrane integrity, there were higher volumes, clearer matrices, and lesser cristae within the mitochondria.

The different states of mitochondrial respiration are indicated in Figure 4A: basal respiration (i.e., basal), proton leak (i.e., respiration after oli addition), maximal respiratory capacity (i.e., respiration after FCCP addition), and non-mitochondrial respiration (i.e., after rot/AA addition). There was a slight decrease of OCR only in BEAS-2B repeatedly exposed to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$ . Accordingly, Figure 4B indicated reduced ATP concentrations in these cells ( $p < 0.01$ ). Taken together, these results are consistent with a reduction of OXPHOS possibly relying on the production of mtROS, which only occurred in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$ .

**Figure 4**



**Figure 4:** Oxygen consumption rate (OCR) and ATP concentrations of human bronchial epithelial BEAS-2B cells, grown submerged, as negative controls or repeatedly exposed to 2 or  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived  $\text{PM}_{2.5}$  collected during the spring-summer (SS) and autumn-winter (AW) seasons. Figure 4A shows OCR as studied using the Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) after the sequential addition of oligomycin (i.e., oli,  $1\mu\text{M}$ ), 2-[2-(3-Chlorophenyl) hydrazinylydene]propanedinitrile (FCCP;  $0.25\text{-}0.5\mu\text{M}$ ), rotenone (i.e., rot,  $1\mu\text{M}$ ), and antimycin A (i.e., AA,  $1\mu\text{M}$ ), as published by Carazao-Rosas

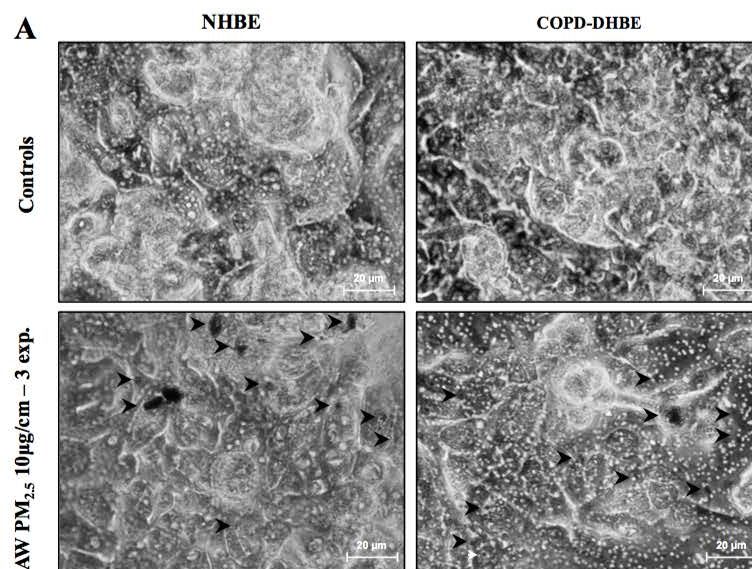


et al. (2013). The different states of mitochondrial respiration of BEAS-2B cells as negative controls or repeatedly exposed to 2 or 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the SS and AW seasons are indicated in Figure 4A: basal respiration (i.e., basal), proton leak (i.e., respiration after oli addition), maximal respiratory capacity (i.e., respiration after FCCP addition), and non-mitochondrial respiration (i.e., after rot/AA addition). Figure 4B depicts the ATP concentrations of BEAS-2B cells, as negative controls or repeatedly exposed to 2 or 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the SS and AW seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n = 3 and 6, respectively). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus BEAS-2B controls: \*\*: *p*<0.01).

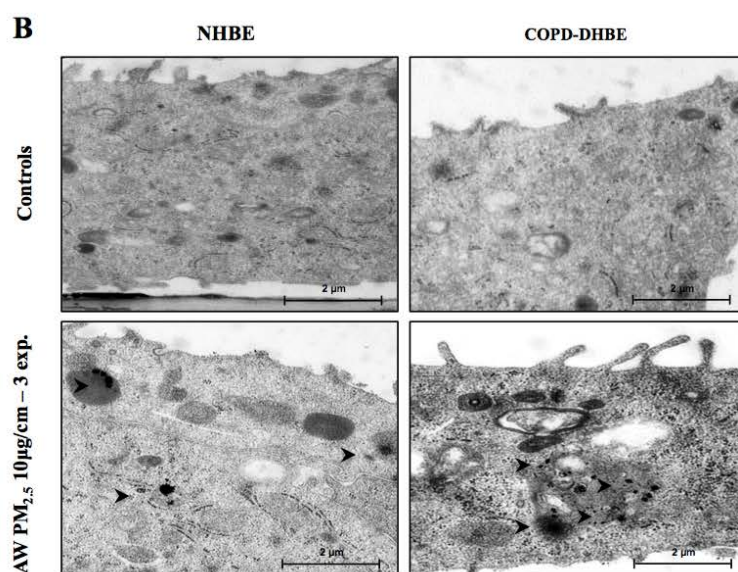
#### Mitochondrial disorders in PM<sub>2.5</sub>-exposed NHBE and COPD-DHBE cells

Mucociliary differentiation of healthy and COPD-diseased HBE cells were checked through morphological observations. Photonic microscopy allowed to confirm that, 24h after PM<sub>2.5</sub>-repeated exposure healthy and COPD-diseased cells were still continuous, adherent, and 3D-differentiated (Figure 5A).

Figure 4



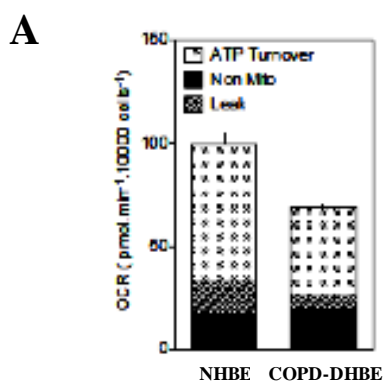
Several particles were observed in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to the highest doses of AW PM<sub>2.5</sub>. TEM observations confirmed the differentiation of these HBE models (Figure 5B). They revealed a tight epithelial sheet containing ciliated cells within the bronchial epithelia, which kept their integrity despite their repeated exposure to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>, as supported by their normal ultrastructure with tight junctions, microvilli, ciliated cells and goblet cells. Particles inside the epithelia were included in vesicles located either in the apical cytoplasm or in the basal cytoplasm.

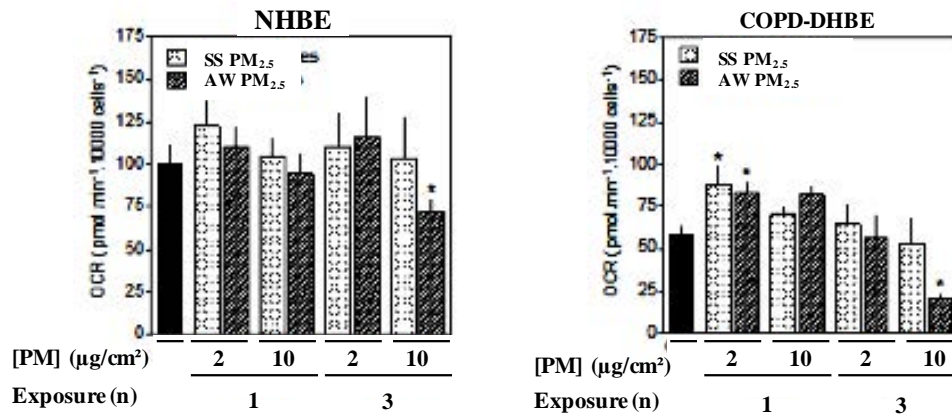
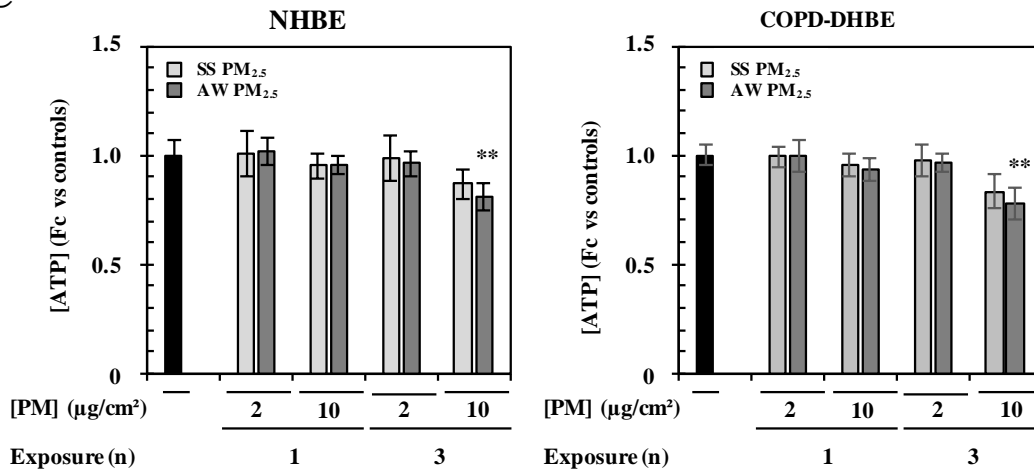


**Figure 5:** Observations of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, grown and thereafter differentiated for 21 days at the air-liquid interface (ALI), as negative controls or repeatedly exposed to  $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of air-pollution-derived  $\text{PM}_{2.5}$  collected during the autumn-winter (AW) season, using photonic microscopy (Figure 5A) and transmission electronic microscopy (TEM; Figure 5B). Photonic microscopy allowed to confirm that, 24h after  $\text{PM}_{2.5}$ -repeated exposure healthy and COPD-diseased cells were still continuous, adherent, and differentiated. Several particles were observed in NHBE and COPD-DHBE cells repeatedly exposed to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$  (Figure 5A). Moreover, TEM observations confirmed the differentiation of these HBE models (Figure 5B). They revealed a tight epithelial sheet containing ciliated cells within the bronchial epithelia, which kept their integrity despite their repeated exposure to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$ , as supported by their normal ultrastructure with tight junctions, microvilli, ciliated cells and goblet cells. Particles inside the epithelia were included in vesicles located either in the apical cytoplasm or in the basal cytoplasm.

As shown in Figure 6A, there were a clear reduction of OCR in COPD-DHBE versus NHBE cell controls. As above-reported in BEAS-2B cells, significant decreases of OCR were reported only in healthy and particularly COPD-diseased HBE cells repeatedly exposed to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$  (Figure 6B). The observed changes of OXPHOS were corroborated by those of ATP concentrations. Taken together, these results are consistent with a reduction of the OXPHOS possibly relying on the local production of mtROS in healthy and with more considerable effects in COPD-diseased cells, repeatedly exposed to the highest dose of AW  $\text{PM}_{2.5}$ .

**Figure 5**



**B****C**

**Figure 6:** Oxygen consumption rate (OCR) and ATP concentrations of normal human bronchial epithelial (NHBE) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)-diseased human bronchial epithelial (DHBE) cells, grown and thereafter differentiated for 21 days at the air-liquid interface (ALI), as negative controls or repeatedly exposed to 2 or 10 µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the spring-summer (SS) and autumn-winter (AW) seasons. The Figure 6A shows OCR of NHBE and COPD-DHBE cell controls as studied using the Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) after the sequential addition of oligomycin (i.e., oli, 1 µM), 2-[2-(3-Chlorophenyl) hydrazinylydene]propanedinitrile (FCCP; 0.25-0.5 µM), rotenone (i.e., rot, 1 µM), and antimycin A (i.e., AA, 1 µM), as published by Carazao-Rosas et al. (2013). The Figure 6B depicts OCR of NHBE and COPD- DHBE cells, as negative controls or repeatedly exposed to 2 or 10 µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the SS and AW seasons. Figure 6C depicts the ATP concentrations of NHBE and COPD- DHBE cells, as negative controls or repeatedly exposed to 2 or 10 µg/cm<sup>2</sup> of air-pollution-derived PM<sub>2.5</sub> collected during the SS and AW seasons. Values are depicted as means and standard deviations (i.e., n = 3 or 6, respectively). (Mann-Whitney U test, with *p* value correction for multiple comparisons; versus NHBE or COPD-DHBE controls: \*: *p*<0.05).

## DISCUSSION

The experimental strategy we developed aimed not only to better evaluate the possible role of ROS-related mitochondrial disorders in the harmful effects induced by air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> in BEAS-2B cells, but also to better demonstrate the more sensitive responsiveness of COPD-diseased cells versus healthy HBE cells. Actually, only very few studies used such relevant lung cell systems to study PM-induced underlying mechanisms, and, among them, even less differentiate them at ALI (Boublil et al., 2013). The non-cytotoxic doses of SS and AW PM<sub>2.5</sub> we used to study the mitochondrial disorders were among the lowest reported in the literature to give

significantly harmful effects (Boublil et al., 2013; Leclercq et al., 2016; Longhin et al., 2013). It is also of great importance to diminish as much as possible the PM doses to be able to study the underlying mechanisms while staying as close as possible to realistic exposure levels.

To better elucidate whether mitochondrial disorders will be closely related to cell homeostasis maintenance, BEAS-2B cells were repeatedly exposed to both PM<sub>2.5</sub> samples. Oxidative stress being often considered to be a primary toxicity effect of air pollution-derived PM; indeed, a dose- and exposure-dependent oxidative stress occurred in BEAS-2B cells exposed to SS and particularly AW PM<sub>2.5</sub> samples. The AW PM<sub>2.5</sub> sample also contained higher concentrations of metals (i.e., 207 versus 160 µg/g), PAHs (i.e., 69.4 versus 25.4 µg/g), PCDD/Fs (i.e., ∑PCDDs: 13.9 versus 11.5 µg/g, ∑PCDFs: 6.37 versus 4.45 µg/g), and DL- and M-PCBs (∑DL-PCBs: 44.5 versus 24.3 µg/g, and ∑M-PCBs: 233 versus 158 µg/g) than the SS PM<sub>2.5</sub>. Prooxidant effects induced by the exposure to PM<sub>2.5</sub> samples could also be related to the presence of some metals (e.g., Al, Cr, Cu, Fe, Mn, and Zn) and organic species (e.g., PAHs), generally associated with redox reactions (Leclercq et al., 2016). Interestingly, while slightly increases of Nrf2 binding activity and SOD activity were reported in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of SS PM<sub>2.5</sub>, in contrast, significant decreases were observed after repeated exposures to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>, suggesting that the oxidative defences within these cells did not yet counteract the excessive production of ROS (Chao and Kleeberger, 2015; Holmström et al., 2016; Leclercq et al., 2016). While accumulating evidence showed that increased mtROS production, extracellular ATP, and mitochondrial DNA release cause inflammatory responses, which, in turn, aggravate mitochondrial dysfunction, so the mtROS production as well as mitochondrial integrity were evaluated. They were closely consistent with the subsequent reduction of OXPHOS, which only occurred in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub> (Yue and Yao, 2016). Although the role of ROS in pathogenesis has been heavily debated within the last decade, targeted mitochondrial dysfunction, at times accompanied by elevated mtROS, is still alternatively associated with negative or positive effects on organismal health (Lerner et al., 2016). The thresholds and timing of ROS stress regarding hermetic means of organismal protection also still lacks clarity. For instance, many tumour cells exhibit excessive glucose conversion to lactic acid in the presence of oxygen as well as concomitantly suppressed mitochondrial respiration. This phenomenon, known as the Warburg effect, in cancer cells clearly demonstrates that mitochondria are dysfunctional by utilizing glycolysis to generate ATP. Despite oxygen being present, tumour cells prefer to generate ATP rapidly via glycolysis (Vyas et al., 2016). When the balance between glycolysis and OXPHOS is disrupted, mitochondrial metabolites accumulate in the cytoplasm and influence metabolism. A side effect of such an imbalance is hypoxia or low oxygen levels; these hypoxic conditions are thought to drive cancer progression by promoting genomic instability (Roberts and Thomas, 2013). Therefore, the ROS-related mitochondrial disorders occurring in BEAS-2B cells repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>, which contains the highest concentrations of some well-known harmful chemicals, sometimes classified by IARC for their carcinogenicity in humans, were in line with those which could appeared in cancer cells.

To go even farther in this work by validating such PM-induced mitochondrial disorders in more relevant lung cell systems, NHBE and highly sensitive COPD-DHBE cells were repeatedly exposed to the SS and AW PM<sub>2.5</sub> samples. The cell culture conditions we used in this work ensure that HBE cells exhibit a differentiation phenotype, showing similarity points with *in vivo* HBE (Bérubé et al., 2010; Boublil et al., 2013; Pezzulo et al., 2011). Indeed, Leclercq et al. (2016) showed that NHBE and COPD-DHBE cells and their cell culture conditions allowed us to get as close as possible to *in vivo* conditions found in HBE. Morphological observations in photonic and mainly in TEM supported that, 24h after PM<sub>2.5</sub>-repeated exposure healthy and COPD-diseased HBE exhibit a normal ultrastructure and mucociliary differentiation in tight epithelial sheet containing ciliated cells within the bronchial epithelia, which kept their integrity, as supported by their normal ultrastructure with tight junctions, microvilli, ciliated cells and goblet cells (Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2015 ; Boublil et al., 2013; Pezzulo et al., 2011). The efficiency of the repetitive exposure strategy was also confirmed by the presence of some particles which remained visible inside the epithelia, in vesicles located either in the apical or basal cytoplasm. The primary function of HBE cells being to act as a defensive barrier aiding the maintenance of normal airway function, they are major target of inhaled pollutants. However, HBE cells can also serve as effectors to initiate and orchestrate immune and inflammatory responses as well as produce excess ROS as a result of an oxidant/antioxidant imbalance that contributes to chronic pulmonary inflammation and lung tissue damage (Gao et al., 2015). Accordingly, Leclercq et al. (2016) recently reported exposure-dependent increases of lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA adduct formation, on the one hand, and alterations of antioxidant defences, on the other hand, in NHBE and more importantly in COPD-DHBE cells, exposed to air pollution-derived PM. Accordingly, Caramori et al. (2011), Fischer et al. (2015), and Gao et al. (2015) showed that COPD states is associated with a rising oxidative stress, rendering them more sensible to the other harmful effects of inhaled toxicants. These findings indicated a chronic lack of protection against oxidative stress, providing a mechanism by which HBE cells contribute to cigarette smoke-induced oxidative damage found in patients with COPD (Gao et al., 2015). As above-reported in BEAS-2B cells, significant decreases of OCR, also corroborated by those of ATP concentrations, were reported only in healthy and particularly COPD-diseased HBE cells repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>. Lerner et al. (2016) supported that mitochondrial dysfunction

associated with aging, and together with chronic smoking, may increase the risk of developing a state of progressive inflammation in the lung. The nature of inflammatory diseases is such that they can become damaging or chronic once they pass the threshold of inflammation resolution. Factors that may trigger the inflammatory conditions for disease progression may also involve mtROS production. Taken together, these results are consistent with a reduction of the OXPHOS possibly relying on the local production of mtROS in healthy and with more considerable effects in COPD-diseased cells, repeatedly exposed to the highest dose of AW PM<sub>2.5</sub>.

These results supported for the first time the reduction of the mitochondria OXPHOS as a crucial underlying mechanism closely involved in the toxicity induced by repeated exposure to air pollution-derived PM<sub>2.5</sub> in NHBE and particularly sensitive COPD NHBE cells.

## FUNDING SOURCES

This work benefited from grants from the ITMO Cancer (i.e., Plan Cancer 2009-2013, Contract n°ENV201210), the University of Lille, and the Mines de Douai. BL's PhD is supported by the Région Nord-Pas de Calais and the Mines de Douai (Contract n°13005131).

## CONFLICT OF INTEREST

All authors of this manuscript do not have any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

## REFERENCES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2009. Air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an *in vitro* coculture lung model *Toxicol In vitro* 2, 37-46.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2010. Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after *in vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub> *Chem Biol Interact* 188, 558-565.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., André, V., Gosset, P., Billet, S., Le Goff, J., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., Shirali, P., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model *J Appl Toxicol* 33, 109-119.
- Abbas, I., Verdin, A., Escande, F., Saint-Georges, F., Cazier, F., Mulliez, P., Courcot, D., Shirali, P., Gosset, P., Garçon, G., 2016. *In vitro* short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5-0.3</sub> induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Env Res* 147, 146-158.
- Aggarwal, S., Mannam, P., Zhang, J. 2016. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311, L433-L452.
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Le Goff, J., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., Sichel, F., 2010. Mutagenicity and genotoxicity of PM<sub>2.5</sub> issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France) *J Appl Toxicol* 31, 131-138.
- Beelen, R., Raaschou-Nielsen, O., Stafoggia, M., 2013. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *The lancet* 383, 785-795.
- Bérubé, K.A., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology* 278, 311-318.
- Bhowmick R., Gappa-Fahlenkamp H., 2015. Cells and culture systems used to model the small airway epithelium. *Lung* DOI 10.1007/s00408-016-9875-2
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P., 2007. Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): 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., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* 270, 144-155.
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium *in vitro* to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in vitro* 27, 533-542.

- Cho, H.J., Kleeberger, S.R. 2015. Association of Nrf2 with airway pathogenesis: lessons learned from genetic mouse models. *Arch Toxicol* 89, 1931-1957.
- Coller, H.A. 2014. Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol.* 184(1), 4-17.
- Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., Andre, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garçon, G., Malet-Martino, M., Balayssac, S., Rocchi, S., Savina, A., Formstecher, P., Mortier, L., Kluza, J., Marchetti, P. 2013. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget*, 4(11), 1986-1998
- Dagher, Z., Garçon, G., Gosset, P., Ledoux, F., Surpateanu, G., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2005. Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 25, 166-175.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Activation of different pathways of apoptosis by Dunkerque city air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* 225, 12-24.
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2007. Role of Nuclear Factor-kappa B Activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 27, 284-290.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) produced in rural-, urban-, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem Res Toxicol* 25, 904-919.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Env Res* 137, 256-267.
- Ferecatu, I., Borot, M.C., Bossard, C., Leroux, M., Boggetto, N., Marano, F., Baeza-Squiban, A., Andreau, K. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Part Fibre Toxicol.* 7, 1-14.
- Fischer, B.M., Voynow, J.A., Ghio, A.J. 2015. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int. J COPD* 10, 261-276.
- Gao, W., Li, L., Wang, J., Zhang, S., Adcock, I.M., Barnes, P.J., Huang, M., Yao, X. 2015. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology* 20, 722-729.
- Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P., 2006. Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol in vitro* 20, 519-528.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.J., Camatini, M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat Res* 713, 18-31.
- Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D., 2014. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 122, 906-911.
- Holmström, K.M., Kostov, R.V., Dinkova-Kostova, A.T. 2016. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol.* DOI: 10.1016/j.cotox.2016.10.002
- Jerrett, M., Turner, M.C., Beckerman, B.S., Pope III, C.A., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Serre, M., Crouse, D., Gapstur, S.M., Krewski, D., Diver, W.R., Coogan, P.F., Thurston, G.D., Burnett, R.T. Comparing the health effects of ambient particulate matter estimated using ground-based versus remote sensing exposure estimates. *Environ Health Perspect* DOI: 10.1289/EHP575.
- Johannson, K.A., Balmes, J.R., Collard, H.R. 2015. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease? *CHEST* 147(4), 1161-1167.
- Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P., 2010. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) collected in Abidjan., Côte d'Ivoire. *J. Appl. Toxicol.* 30, 310-320.
- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E.M., Alleman, L.Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B.M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., Garçon, G., 2016. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. *Env. Poll.* 218, 1074-1088.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F. 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicol in Vitro* 28, 866-874.
- Lerner, C.A., Sundar, I.K., Rahman, I. 2016. Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD. *Int J Biochem Cell Biol* doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.026

- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol in vitro* 27, 551-559.
- Longhin, E., Capasso, L., Battaglia, C., Proverbio, M.C., Consentino, C., Cifola, I., Mangano, E., Camatini, M., Gualtieri, M., 2016. Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ Poll* 209, 87-98.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC., Lyon., France, 2013. *Lancet Oncol* 14, 1262-1263.
- Pezzulo, A.A., Starner, T.D., Scheetz, T.E., Traver, G.L., Tilley, A.E., Harvey, B.G., Crystal, R.G., McCray, Jr P.B., Zabner J., 2011. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L25-L31.
- Pope, C.A. 3rd, 2014. Particulate air pollution and lung function. *Am J Respir Crit Care Med.* 190, 485-486.
- Raaschou-Nielsen, O., Beelen, R., Wang, M., Hoek, G., Andersen, Z.J., Hoffmann, B., Stafoggia, M., Samoli, E., Weinmayr, G., Dimakopoulou, K., Nieuwenhuijsen, M., Xun, W.W., Fischer, P., Eriksen, K.T., Sørensen, M., Tjønneland, A., Ricceri, F., de Hoogh, K., Key, T., Eeftens, M., Peeters, P.H., Bueno-de-Mesquita, H.B., Meliefste, K., Oftedal, B., Schwarze, P.E., Nafstad, P., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Penell, J., De Faire, U., Korek, M., Pedersen, N., Östenson, C.G., Pershagen, G., Fratiglioni, L., Concin, H., Nagel, G., Jaensch, A., Ineichen, A., Naccarati, A., Katsoulis, M., Trichpoulou, A., Keuken, M., Jedynska, A., Kooter, I.M., Kukkonen, J., Brunekreef, B., Sokhi, R.S., Katsouyanni, K., Vineis, P. 2016. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ Int.* 87, 66-73.
- Roberts, R.R., Thomas, K.J. 2013. The role of mitochondria in the development and progression of lung cancer *Comput. Struct.Biotechnol. J.* 6 (7), e201303019, <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201303019>
- Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter, PM<sub>2.5</sub>. *Toxicology* 244, 220-230.
- Saint-Georges, F., Garçon, G., Escande, F., Abbas, I., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., 2009. Role of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in the occurrence of loss of heterozygosity in multiple critical regions of 3p chromosome in human epithelial lung cells, L132. *Toxicol Lett* 187, 172-179.
- To, T., Zhu, J., Larsen, K., Simatovic, J., Feldman, L., Ryckman, K., Gershon, A., Lougheed, M.D., Liciskai, C., Chen, H., Villeneuve, P.J., Crighton, E., Su, Y., Sadatsafavi, M., Williams, D., Carlsten, C., and the Canadian Respiratory Research Network, 2016. Progression from Asthma to Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD; Is Air Pollution a Risk Factor? *Am J Respir Crit Care Med.* DOI: 10.1164/rccm.201510-1932OC
- World Health Organization, 2014. 7 million premature deaths annually linked to air pollution. Available at [www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/) viewed May 30, 2016.
- Yu, L., Yao, H. 2016. Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases. *Br J. Pharmacol.* 173, 2305-2318.
- Zhang, J., Ghio, A.J., Gao, M., Wei, K., Rosen, G.D., Upadhyay, D., 2007. Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest, role of G1 cyclins. *FEBS Lett* 581, 5315-5320.
- Zhou, B., Liang, G., Qin, H., Peng, X., Huang, J., Li, Q., Qing, L., Zhang, L., Chen, L., Ye, L., Niu, P., Zou, Y., 2014. p53-dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE cells) by PM<sub>2.5</sub> sampled from air in Guangzhou., China. *Toxicol Mech Methods* 24, 552-559.

**CHAPITRE IV**

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**





**Tableau Récapitulatif des résultats de toxicologie**

Type cellulaire	CEBH saines						CEBH BPCO						BEAS2B	
	PM <sup>4</sup>	PM <sup>2.5</sup> A/H	PM <sup>2.5</sup> P/E	PM <sup>2.5</sup> A/H	PM <sup>2.5</sup> P/E	PM <sup>4</sup>	PM <sup>2.5</sup> A/H	PM <sup>2.5</sup> P/E	PM <sup>2.5</sup> A/H	PM <sup>2.5</sup> P/E	PM <sup>2.5</sup> A/H	PM <sup>2.5</sup> P/E		
Concentration en µg/cm <sup>2</sup>	5	2	10	2	10	5	2	10	2	10	2	10		
<b>Inflammation</b>	+					++								
<b>Stress oxydatif</b>	+					++								
SOD	+					+					+	0		
TAS	-					-								
GSSG/GSH	+					++								
8OHdG	+	++		+	+	++	++	+++	++	+++	+	++		
MDA	+					++								
Protéine-CO	+					++					+	++		
Production de ROS												0		
<b>Métabolisme des xénobiotiques</b>	++					+								
Phase I XMEs	++					+								
Phase II XMEs	+					-								
<b>Présence de HAP</b>	+	+	++	+	++	+	+	++	+	++	+	++		
HAP totaux		+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+++	+	++		
Métabolites des HAP totaux		+	++	+	++	+/-	+	++	+/-	+	+	++		
B(a)p	++	+	+++	+	+++	+	+	+++	+	+++	+	++		
OH-B(a)p	++	+	++	+	++	+/-	+	++	+/-	+	+	++		
Adduits à l'ADN des OH-B(a)p	+	+	+	+	+	++	++	+++	++	+++				
<b>Cassures à l'ADN et chromosomiques</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<b>Modifications épigénétiques</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Méthylation globale de l'ADN	-	-	--	-	--	--	--	---	--	---				
Méthylation de P16	+	+	++	+	++	++	++	+++	++	+++				
DNMT		0	-	0	-		-	--	-	--				
Modifications des histones	0	0	+	0	+	0	+	++	+	++				
HAT		0	+	0	+		+	++	+	++				
HDAC		0	-	0	-		-	--	-	--				
Longueur des télomères	-	-	--	-	--	--	--	---	--	---				
Activité de la télomérase	+	+	++	+	++	++	++	+++	++	+++				
<b>Stress oxydatif mitochondrial</b>		0	-	0	0		0	-	0	0				
Consommation d'oxygène		0	-	0	0		0	--	0	0				
Production d'ATP		0	-	0	0		0	-	0	0				



**Les objectifs de mon travail de thèse ont été d'étudier l'impact de la pollution particulaire sur la santé publique et plus particulièrement sur la cancérogenèse pulmonaire et d'essayer de mettre en relation les caractéristiques physico-chimiques des particules avec leur toxicité.**

(1) La première partie de mon projet a été consacrée aux prélèvements des PM<sub>2.5</sub>, à Lille, au cours de deux saisons contrastées, et à l'évaluation de leurs caractéristiques physico-chimiques ou encore leur bioaccessibilité à la fois dans des milieux de culture cellulaire ou des fluides bronchiques.

La ville de Lille a été choisie pour sa situation urbaine avec un trafic routier important et des influences industrielles présentes mais faibles. Nous avons choisi d'étudier l'impact d'un aérosol urbain sur la cancérogenèse pulmonaire puisque les particules urbaines ont pour sources majoritaires le résidentiel/tertiaire et le trafic automobile. Ces deux sources sont particulièrement émettrices de composés toxiques dont l'implication dans la cancérogenèse pulmonaire n'est plus à démontrer tels que le B[a]P ou encore l'As, Ni, Cr ou Cd. Lille connaît d'importants pics de pollution où les concentrations en particules fines peuvent très nettement dépasser les 25µg/m<sup>3</sup> d'air et ce fut particulièrement le cas en mars 2014 où les concentrations en PM<sub>2.5</sub> ont atteint les 100µg/m<sup>3</sup>. C'est une ville où les enjeux de santé publique et environnementaux sont importants et aucune étude ne s'était intéressée à la toxicité liée aux PM<sub>2.5</sub> prélevées à Lille. Deux campagnes de prélèvements ont été réalisées au cours de deux saisons contrastées (Printemps-Eté 2013 : PE et Automne-Hiver 2013/2014 : AH) afin d'avoir deux aérosols de compositions chimiques différentes et d'en évaluer les effets toxiques. Les analyses physicochimiques réalisées sur les deux prélèvements saisonniers montrent une composition chimique globalement peu différente entre les aérosols d'AH et de PE pour les éléments métalliques mais qui reste en accord avec ce qui a été mesuré dans d'autres villes de la région dont Dunkerque (Mbengue et al. 2014 ; Dergham et al. 2015). Les concentrations liées à la somme totale des éléments inorganiques et à la somme de chaque élément organique (HAP, PCDDs, PCDFs, Dioxines ou furanes), sont plus importantes l'AH que le PE. Il est montré que la composition des particules est fortement influencée par leur localisation, par des facteurs météorologiques ou par les polluants gazeux (Amil et al., 2016). Toutefois, dans notre cas, les particules ont une composition assez similaire qui peut s'expliquer par une météo faiblement différenciée entre les saisons avec un AH 2013/2014 particulièrement doux et un PE 2013 frais.

En effet, si on prend l'exemple du résidentiel qui est une des sources majeures en ville de PM<sub>2.5</sub>, le chauffage utilisé par les foyers Lillois ou de la banlieue Lilloise a fonctionné autant en hiver qu'au printemps. Pour observer des effets toxicologiques marqués entre 2 saisons, il faudrait avoir une composition chimique bien distincte. Pour cela, il serait intéressant pour de futures études de comparer les prélèvements saisonniers de plusieurs années ou collectées dans des environnements géographiques influencés par des sources spécifiques. Pour avoir une étude plus complète, il serait judicieux de confronter les effets toxiques induits par des aérosols urbains, trafics ou ruraux d'un même pays ou pourquoi pas, de comparer plusieurs sites urbains fortement pollués ou pas de différents pays. La faisabilité est une limite importante de ce genre d'analyses toxicologiques puisqu'il faudrait, pour avoir une puissance statistique suffisante, effectuer de nombreux réplicas cellulaires ce qui aurait pour conséquence d'avoir à gérer des milliers de conditions différentes ce qui est pour le moment, techniquement et économiquement peu envisageable.

La bioaccessibilité des composants particuliers, c'est à dire la fraction maximale d'un composé extractible par solubilisation dans des fluides physiologiques, est un volet important à étudier pour mieux apprécier la toxicité des polluants particuliers. Elle nécessite l'utilisation de fluides pulmonaires proches de ceux retrouvés dans les poumons humains et d'utiliser des particules dont la composition chimique ne soit pas trop éloignée de celle retrouvée dans les particules en suspension dans l'air. De plus, cela demande également d'estimer correctement la quantité de particules qui est déposée dans les différents étages pulmonaires chaque jour, le temps de contact moyen entre les particules et les fluides pulmonaires, de même que le ratio solide/liquide (quantité de particules/volume de fluide) et l'efficacité des mécanismes de clairance pulmonaire. Pour répondre au mieux à ces exigences, il est nécessaire de veiller aux conditions de prélèvement et de stockage des particules afin de limiter les contaminations et d'éviter le vieillissement donc l'oxydation des composés particulière. Il est cependant difficile d'évaluer avec précision les paramètres de déposition, de temps de séjour et d'élimination des particules et même si cela peut être appréhendé chez la souris, l'anatomie du poumon de la souris est complètement différente de celle de l'homme, de même que les différents mécanismes décrits ci-dessous. Enfin, il est important de connaître la composition exacte des fluides pulmonaires (mucus et surfactant) ou de disposer de fluides directement prélevés chez l'homme. Actuellement, de nombreuses études s'intéressent à la bioaccessibilité, notamment des métaux, et ce dans des solvants tels que l'eau ou le PBS (Midander et al., 2006 ; Santos et al., 2009 ; Oller et al., 2009 ; Mugica-Álvarez et al., 2011 ; Limbeck et al., 2012). Ces études

montrent non seulement que la bioaccessibilité des métaux dépend de la composition de la solution d'extraction mais également de la température, du pH, du temps de contact avec le milieu, du ratio solide/liquide (Caboche et al., 2011). D'autres tentent de se rapprocher davantage de la composition des fluides pulmonaires et développent des solutions dont le Gamble qui simule le surfactant alvéolaire et contient de la glycine, un acide aminé, et du DPPC pour mimer la présence des lipides (Caboche et al., 2011). Néanmoins, ces solutions ne reproduisent que partiellement les fluides pulmonaires humains. C'est pour cela que dans cette étude nous avons utilisé du mucus directement prélevé chez des patients atteints de BPCO. Sachant, qu'il est impossible d'avoir du mucus de sujets sains, nous avons utilisé du mucus de patients BPCO dont la composition, notamment en mucines, dont MUC5AC, est différente de celle des personnes saines (Turner and Jones, 2009). De plus, de par la difficulté croissante d'avoir accès à des fluides humains, le mucus utilisé dans nos essais, correspond à un mélange issu de 4 patients afin d'avoir suffisamment de solution pour pouvoir reproduire les expérimentations. Le mucus de patient BPCO est très visqueux et reste difficile à homogénéiser, nous l'avons donc dilué au  $\frac{1}{2}$  dans du sérum physiologique pour ne pas en changer la salinité. Après cette dilution, nous en avons eu suffisamment pour faire 4 répliques et par manque de matériel, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer les effets potentiellement liés aux différents temps de traitement et de ratios S/L. Les résultats de ce premier essai ont montré que la bioaccessibilité est plus faible pour certains éléments (Ba, Ce, Mn, Mo, Sb, Sn), proche pour d'autres (As, Bi, Cu, Fe, La, Zn) et plus importante pour le Cr comparée à celle mesurée dans l'eau. La composition saline ainsi que la présence en quantité importante de matière organique peuvent fortement influencer la solubilité des métaux. De plus, sachant que ce premier essai a été réalisé en mélangeant le mucus venant de 4 patients, il serait intéressant de mesurer la bioaccessibilité des métaux dans le mucus de différents individus. Néanmoins, les premières analyses de la composition en métaux majeurs et mineurs des mucus des différents patients montrent des variations (résultats non montrés) laissant penser que la bioaccessibilité peut donc être modifiée dans ces mucus de compositions différentes. De plus, pour avoir le volume nécessaire de mucus, même en le diluant par deux, il faudrait plus d'un an de prélèvements et il serait malgré tout difficile d'en avoir suffisamment pour évaluer les effets liés aux temps de traitement et aux ratios S/L. Il faudrait pouvoir générer des mimétiques de mucus mais pour cela, il faut tout d'abord faire l'analyse de sa composition chimique, c'est à dire quantifier les ions, la quantité de protéines, de lipides, glucides et acides nucléiques et essayer d'identifier les plus représentés de chaque catégorie. Néanmoins, l'analyse ne pourrait être réalisée que sur des mucus pathologiques et même si cela serait intéressant d'en connaître la composition, il n'est

pas certain que nous soyons en mesure de reproduire le mucus *in vitro*. Concernant le choix des particules, il faut limiter les contaminations lors du prélèvement mais également des analyses et veiller à de bonnes conditions de stockage afin d'en limiter l'évolution, notamment vis à vis des composés organiques. La bioaccessibilité des métaux a été réalisée sur les PM<sub>2.5</sub> issues de la saison AH, il faudrait donc effectuer les mêmes analyses sur les prélèvements PE ou encore sur des aérosols issus d'autres villes en les comparant à ceux échantillonnés en milieu rural ou industriel.

La bioaccessibilité des métaux adsorbés sur les PM<sub>2.5</sub> a aussi été quantifiée dans des milieux de culture cellulaire (LHC-9) et dans du milieu LHC-9 consommé par des cellules et ce en les comparant à celles obtenues dans l'eau et le PBS. Nous avons pris en considération les temps de contact entre les particules et les milieux et également les différents ratios S/L. En effet, peu d'études s'intéressent à la solubilité des métaux dans du milieu de culture cellulaire alors que c'est un paramètre indispensable pour trouver les conditions optimales de solubilisation des composés chimiques particuliers qui soient les plus proches des conditions retrouvées dans les poumons humains. En effet, la plupart des tests de toxicologie des particules est réalisée dans différents types cellulaires, avec différentes conditions de culture ou de traitement et ne prend pas en considération la solubilité des métaux ou des autres composés particuliers. Il est donc nécessaire d'évaluer la bioaccessibilité des métaux particuliers pour mieux appréhender les mécanismes toxicologiques inhérents aux PM<sub>2.5</sub>. Cependant, peu de variations sont mesurées entre le LHC-9 et celui qui a été en contact avec les cellules. Cela sous-entend que ce qui est produit par les cellules, dans les conditions de notre expérience, n'a probablement pas d'action importante sur la solubilisation des métaux. En revanche, ce résultat ne prend pas en compte l'activité des cellules qui peuvent être en contact par leur matrice extracellulaire avec les particules ou encore les internaliser ce qui peut favoriser la solubilisation des métaux ou autres composés chimiques particuliers. Cependant, la réalisation de telles expérimentations reste compliquée à envisager pour des raisons techniques puisqu'il serait difficile de solubiliser les éléments particuliers directement dans les puits de culture contenant les cellules. En effet, le changement régulier de contenants, c'est à dire les passages entre les boîtes de culture et les tubes, n'assurerait pas de récupérer les particules de manière homogène pour pouvoir ensuite doser les métaux et ne pas avoir d'écart-types trop importants. Nous pourrions faire quelques essais afin de vérifier la faisabilité sur un nombre important de réplicas pour espérer obtenir des résultats homogènes mais une nouvelle fois, ceci représenterait des expérimentations lourdes à gérer. En plus d'évaluer la solubilité des métaux dans les

milieux de culture en fonction du temps d'exposition et des ratios S/L, nous avons voulu mesurer quelques paramètres de toxicologie afin de déterminer quelle fraction (totale, soluble et insoluble), quel temps d'exposition et quel ratio S/L présente le plus de toxicité. Pour cela, la cytotoxicité (G6PD) et l'inflammation (IL-6 et IL-8) ont été mesurées dans les surnageants de milieux de culture de cellules BEAS-2B traitées 72h par la fraction totale, soluble et insoluble de PM<sub>2.5</sub>. Les particules (2µg) ont été pré-incubées pendant 6, 24 ou 72h avec des ratios de 1/6,000, 1/21,000, et 1/100,000 dans du LHC-9 avant d'être déposées sur les cellules. Ces ratios et temps de traitement correspondent à ceux classiquement utilisés dans les essais toxicologiques *in vitro* des PM. De manière intéressante, toutes les fractions sont impliquées dans la faible cytotoxicité mesurée et dans la sécrétion de cytokines par les cellules traitées aux PM<sub>2.5</sub>. Cependant, les résultats de toxicologie ne peuvent pas uniquement s'expliquer par la solubilisation des métaux et leur présence dans les différentes phases. En effet, même si les métaux sont impliqués dans la toxicologie liée aux PM<sub>2.5</sub> puisqu'ils agissent dans la mise en place du stress oxydatif qui lui-même va favoriser l'inflammation dans les cellules traitées aux PM<sub>2.5</sub>, il est probable que d'autres composés chimiques particuliers, notamment organiques, soient impliqués dans ces mécanismes. Il apparaît nécessaire d'évaluer la bioaccessibilité des autres composés particuliers dont les HAP, furanes ou dioxines qui présentent une toxicité particulièrement importante. Il serait intéressant d'évaluer la bioaccessibilité et la toxicité des fractions totales, solubles et insolubles de particules prélevées sur plusieurs sites (urbain, trafic, rural et industriel) car il est probable que les faibles différences que nous avons mesurées soient beaucoup plus marquées pour le cas de particules industrielles qui présentent une composition en métaux et une spéciation chimique très différente des particules urbaines.

(2) La seconde partie de mon projet a été consacrée aux analyses toxicologiques *in vitro* des PM<sub>2.5</sub>. Au cours de nos différents essais nous avons utilisé un modèle de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (CEBH) issues de sujets sains et de patients atteints de broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), cultivées à l'Interface Air Liquide (IAL) et exposées de manière réitérée à des PM<sub>4</sub> ou des PM<sub>2.5</sub>.

En attendant de récupérer les PM<sub>2.5</sub> des campagnes de prélèvement des particules à Lille (entre automne 2013 et l'été 2014), nous avons mis au point le modèle de culture cellulaire (CEBH saines et pathologiques) cultivées à l'IAL de même que des conditions d'exposition aux particules. Nous avons tout d'abord, par des expériences d'immunofluorescence sur des marqueurs tels que la cytokératine ou MUC5AC, vérifié que le modèle cellulaire utilisé



correspondait bien à des cellules épithéliales bronchiques humaines. Les particules que nous avons utilisées, pour les premiers essais, sont des PM<sub>4</sub> urbaines commerciales caractérisées (SRM2786), prélevées à Prague et fournies par le *national Institute of Standards and Technology* (NIST). Ces particules présentent l'avantage d'être facilement accessibles, d'être caractérisées pour un grand nombre de composés dont des HAP, des nitro-HAP, des PBDE et des métaux. Le désavantage réside principalement dans les conditions techniques de prélèvement ou de stockage que nous ne maîtrisons pas. Les cellules saines et pathologiques cultivées à l'IAL ont été exposées de façon réitérée (24 et 72h) à ces PM<sub>4</sub> à la concentration déterminée comme non-cytotoxique de 5 µg/cm<sup>2</sup>. Nous avons montré que les cellules BPCO conservent leurs caractéristiques physiopathologiques. De plus, l'exposition des cellules saines aux PM<sub>4</sub> entraîne une inflammation et un stress oxydatif élevé, une formation importante d'adduits à l'ADN (OH-HAP et 8OHdG), une augmentation des enzymes de phase 1 et 2 du métabolisme des xénobiotiques, une diminution de la méthylation globale de l'ADN, l'hyperméthylation du promoteur du gène P16, un raccourcissement marqué des télomères et l'activation de la télomérase et ce de manière plus marquée dans les cellules de patients atteints de BPCO. Par la suite, nous avons utilisé les particules fines (PM<sub>2,5</sub>) prélevées à Lille au cours des saisons AH 2013/2014 et PE 2014 et avons évalué leur toxicité sur les cellules CEBH issues de 5 sujets sains et des CEBH issues de 5 patients BPCO dans le but d'avoir suffisamment de répliques et également pour avoir le reflet des différences interindividuelles. Ces cellules, cultivées à l'IAL, ont été exposées de manière réitérée (24 et 72h) aux PM<sub>2,5</sub> aux concentrations 2 et 10 µg/cm<sup>2</sup>. De la même manière que pour les cellules exposées aux PM<sub>4</sub>, nous avons mesuré une augmentation de la formation d'adduits à l'ADN, un raccourcissement des télomères, la réactivation de la télomérase mais également des modifications épigénétiques telles que la diminution de la méthylation globale de l'ADN ou encore des modifications des histones. Toutefois, même si nous avons observé l'augmentation de la formation d'adduits à l'ADN, nous n'avons pas été en mesure de détecter d'effet génotoxique (clastogène ou aneugène). En plus, nous avons clairement mesuré un stress oxydant par la production de mtERO ainsi qu'une diminution de la capacité respiratoire des cellules et ce pour les particules de la saison AH mettant d'autant plus l'accent sur l'utilisation d'aérosols de diverses origines. Cependant, les effets toxiques induits par les particules fines peuvent être différents selon les travaux puisque les PM<sub>2,5</sub> utilisées peuvent présenter des compositions chimiques variées avec une origine rurale, industrielle ou urbaine et provenir de différents pays. Les modèles cellulaires diffèrent également à la fois par l'utilisation de cellules cancéreuses, de cellules immortalisées ou de cultures primaires. Les conditions de culture et d'exposition des cellules changent d'études en

études avec des variations de concentrations en  $PM_{2.5}$  ou des temps d'exposition. Toute cette diversité dans les études de toxicologie des particules et particulièrement des  $PM_{2.5}$  complique l'interprétation des différents résultats et surtout rend compliquée la comparaison des investigations entre elles. Il serait donc nécessaire que la communauté scientifique uniformise les modèles et surtout trouve des modèles qui se rapprochent le plus des vraies conditions rencontrées chez l'homme.

Les différentes études toxicologiques, réalisées au cours de ma thèse, m'ont permis de montrer que les particules fines induisent des effets cellulaires variés dont un stress oxydatif important se traduisant par des atteintes mitochondriales ou encore des atteintes génomiques et des modifications épigénétiques. Elles ont également souligné l'importance d'utiliser le modèle de CEBH BPCO afin de prendre en compte un des facteurs de sensibilité de la population exposée à la pollution de l'air. Ces cellules BPCO ont été choisies parmi plusieurs cellules pathologiques pour répondre à la problématique du lien entre la pollution particulaire et la cancérogenèse pulmonaire. En effet, les cancers pulmonaires et les BPCO présentent des caractéristiques communes dont l'étiologie fortement liée au tabagisme, des antécédents génétiques mais également des expositions environnementales et les processus inflammatoires sous-jacents communs (Durham et al., 2015). Il est de plus montré que les patients atteints de BPCO ont un risque plus élevé de développer un cancer du poumon et ce, de manière indépendante au tabagisme (Young et al., 2009). De plus, la mise en place d'une inflammation chronique associée à la BPCO participe à la cancérogenèse pulmonaire (Raviv et al., 2011). Les  $PM_{2.5}$  vont favoriser le stress oxydatif et l'inflammation à la fois au niveau local et systémique ce qui va profondément affecter les capacités respiratoires et le système immunitaire des patients et contribuer à l'aggravation des symptômes des patients BPCO (Ling and van Eeden., 2009). Par conséquent, les  $PM_{2.5}$  pourraient favoriser, par l'inflammation, le stress oxydatif et d'autres mécanismes encore non identifiés, l'aggravation de la BPCO et la mise en place de la cancérogenèse pulmonaire. Il serait intéressant d'évaluer les effets des particules fines dans d'autres modèles pathologiques tels que l'asthme, la rhinite allergique ou encore la fibrose pulmonaire. Actuellement, un étudiant en thèse au laboratoire s'intéresse aux modèles CEBH saines, BPCO mais aussi asthmatiques et évalue les effets toxiques des particules ultrafines. Ces différents résultats mettent aussi en avant l'importance d'utiliser des cellules primaires épithéliales bronchiques humaines saines et pathologiques et de les différencier à l'IAL. Effectivement, une étude montre que les sécrétions protéiques des CEBH en culture à l'IAL

sont identiques aux sécrétions pulmonaires humaines (Kesimer et al. 2009). Aussi, les travaux de Ghio et al., 2013 démontrent que les cellules cultivées à l'IAL et exposées aux particules atmosphériques vont présenter des effets biologiques moins prononcés que les mêmes cellules cultivées en phase immergée. Cependant, pour de futures investigations et pour avoir un modèle proche de ce qui est retrouvé dans les bronches humaines, il serait intéressant d'utiliser des modèles de co-culture. Effectivement, la co-culture de CEBH avec des fibroblastes favoriserait la croissance des CEBH puisqu'il est montré que les fibroblastes peuvent stimuler le fonctionnement de l'épithélium par la sécrétion de médiateurs (Costea et al., 2003). Par ailleurs, il est montré par Iskandar et al., (2015) que les co-cultures de cellules épithéliales bronchiques à l'IAL et de fibroblastes présentent une capacité de défense à la fumée de cigarette plus importante que les cellules épithéliales bronchiques seules cultivées à l'IAL. De même, la co-culture de cellules épithéliales et de macrophages alvéolaires traitées à des particules variées (TiO<sub>2</sub>, PM, etc) entraîne une réponse inflammatoire plus marquée comparée aux cellules épithéliales seules (Tao and Kobzik., 2002). En présence de plusieurs types cellulaires, les réponses toxicologiques associées à l'exposition à un xénobiotique peuvent fortement varier d'où la nécessité d'utiliser ce genre de modèle pour l'étude de l'impact des PM<sub>2.5</sub>. Nous avons fait le choix d'exposer les cellules à des doses relativement faibles de PM<sub>4</sub> ou des PM<sub>2.5</sub> au regard de ce qui est fait dans la littérature (Longhin et al., 2013) et d'exposer les cellules de manière réitérée à raison d'une exposition toutes les 24h pendant 24 ou 72h. Toutefois, manquant de matériel particulaire pour générer un aérosol et exposer les cellules à un aérosol de PM<sub>2.5</sub>, nous avons traité les cellules par une solution de particules reprises dans du tampon phosphate. Cette méthode d'exposition peut entraîner des biais d'agglomération, de solubilisation ou de réactions au sein des particules. Par exemple, les éléments particulaires hydrosolubles peuvent se lier aux protéines, aux antioxydants ou à d'autres substances contenues dans le milieu de culture cellulaire. De plus, les éléments solubles, une fois présentés à la surface des cellules, vont interagir d'une manière différente avec les récepteurs cellulaires qu'ils le feraient s'ils étaient liés au corps particulaire (Cheng et al., 2003 ; Karlsson et al., 2013). Les ultrasons sont utilisés pour homogénéiser la suspension particulaire dans le tampon phosphate et peuvent casser des liaisons dont celles avec des composés organiques apolaires qui du fait de leur faible solubilisation pourraient ne jamais entrer en contact avec les cellules. Une étude utilisant des CEBH à l'IAL et exposées à des particules par le biais d'un aérosol montre une augmentation de certains paramètres toxicologiques dont l'inflammation (Volckens et al., 2009).

Mon travail de thèse s'est efforcé de se rapprocher le plus possible des conditions rencontrées dans les poumons humains. Nous avons utilisé des cultures primaires de CEBH différenciées à l'IAL en prenant en compte les variabilités interindividuelles et un des contextes de sensibilité de la population représenté par les cellules BPCO. Comme discuté ci dessus, il serait nécessaire pour de futures études de prendre d'autres modèles cellulaires pathologiques, d'envisager la co-culture des CEBH avec d'autres types cellulaires tels que des macrophages ou fibroblastes et d'exposer les cellules par un aérosol de PM<sub>2.5</sub>. En plus de cela, il faudrait envisager d'exposer les cellules à des temps plus longs et des concentrations plus faibles en PM<sub>2.5</sub> afin de refléter les niveaux inhalés de manière quotidienne par la population et ainsi essayer d'être plus proches d'une exposition chronique. C'est d'autant plus le cas pour les travaux qui s'intéressent à la cancérogenèse puisque c'est un processus long et multifactoriel qui résulte d'une succession de mutations sur des gènes impliqués dans de nombreux processus dont l'inflammation, la survie/mort cellulaire, la prolifération, la dérégulation du métabolisme énergétique ou encore l'instabilité génomique (Hanahan and Weinberg., 2011). Dans notre étude nous avons observé la suractivation d'un certain nombre des facteurs également impliqués dans la cancérogenèse, tels que l'inflammation, le métabolisme énergétique, la réplication ou la stabilité du génome et ce, suite à l'exposition aux particules. Nous avons mesuré une augmentation significative de la méthylation du promoteur P16, un inhibiteur du cycle cellulaire, laissant penser à une diminution voire répression de sa transcription et traduction et donc une modification du cycle cellulaire allant dans le sens de la prolifération. En ce sens, nous avons évalué l'état du cycle cellulaire des cellules CEBH et des BEAS2B exposées de manière réitérée à 2 et 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>2.5</sub> toutes les 24h pendant 24 ou 72h et nous n'avons trouvé aucune différence significative dans les cycles de ces cellules. De même nous avons étudié, sur ces mêmes cellules exposées, par une technique qui permet de détecter des protéines d'intérêt et d'en effectuer une semi-quantification (*Western Blot*), plusieurs protéines impliquées dans la survie, l'apoptose ou la prolifération. Nous n'avons identifié aucune cible dont l'expression peut varier significativement suite à un traitement aux particules si ce n'est peut-être la protéine ERK qui semble être phosphorylée suite aux traitements par les particules et que cette activation semble être en lien avec l'activation du récepteur tyrosine kinase EGFR (résultats non montrés). Cependant, aucun phénotype d'une prolifération plus active ou d'une survie plus importante des cellules n'a été mesuré dans nos études. Dans le même sens que nos résultats, une étude de Rumelhard et al., 2007, montre une augmentation de différents récepteurs de l'EGF qui conduit non pas à une modification de la prolifération cellulaire mais favoriserait l'inflammation induite par les PM<sub>2.5</sub>. Une étude réalisée sur le cancer du colon

associe l'activation de l'EGFR au récepteur AHR qui viendrait par la protéine SRC activer EGFR et favoriser la cascade des MAPK conduisant à l'activation de ERK. Cette activation entrainerait la prolifération des cellules cancéreuses du colon (Xi et al., 2011). Il est probable que les mécanismes conduisant à l'activation de l'EGFR par les PM<sub>2.5</sub> dans les CEBH soient différents de ceux impliqués dans le cancer du colon. Toutefois, la piste du récepteur AHR pourrait être creusée pour essayer d'évaluer si l'activation de EGFR et ERK est importante pour la mise en place des mécanismes conduisant à la cancérogenèse induite par les particules. En plus de cela, nous avons réalisé une étude pangénomique et miRNomique des différentes CEBH saines et BPCO traitées aux PM<sub>2.5</sub> issues des 2 saisons dont les résultats, qui sont en cours de traitement, devraient confirmer certaines pistes et en mettre d'autres en avant. Les différents effets que nous observons suite à l'exposition des cellules aux PM<sub>2.5</sub> reflètent les premières réactions des cellules vis à vis des agressions extérieures. Il est probable qu'une partie ou une totalité de ces effets soit gérée et/ou réparée par les cellules surtout si l'agression est courte avec une faible concentration de particules. Même si les dérégulations que nous obtenons sont proches de celles observées dans le cancer, il est difficile de conclure que ces effets soient bien ceux qui sont réellement impliqués dans la cancérogenèse pulmonaire tant que nous n'obtenons pas de phénotype cellulaire « transformé » laissant penser à des caractéristiques cancéreuses. C'est pour cela qu'il serait nécessaire de développer des méthodologies d'exposition des cellules à plus long terme, en utilisant des lignées comme les BEAS2B qui présentent l'avantage d'avoir une prolifération « infinie » mais le désavantage d'être transformées. Au laboratoire nous avons fait un premier essai durant 2 mois en traitant les cellules BEAS2B tous les 3 jours à 0,1 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>2.5</sub>. Par cette expérience nous nous rapprochons des vraies conditions d'exposition de la population. De manière intéressante, nous avons observé après environ 15 jours de traitement une mortalité accrue dans nos boîtes de pétri puis une reprise soudaine de la prolifération par des clones qui ont formé des colonies qui ont par la suite recolonisé la boîte. Des échantillons de cellules ont été prélevés toutes les semaines en vue d'effectuer des analyses sur certains gènes retrouvés dérégulés dans les cancers pulmonaires et les analyses sont en cours. Ce genre d'expérimentation pourrait être réalisé sur des CEBH à l'IAL puisque le fournisseur des cellules garantit une différenciation d'un mois sans dérives, ceci permettrait d'avoir des cellules non transformées dans un état différencié et d'intégrer les cellules BPCO pour évaluer si les particules représentent un facteur aggravant des cancers pulmonaires. En effet, la pollution particulaire a été classée cancérogène pour l'homme par le CIRC (groupe 1). Néanmoins, cette classification englobe l'ensemble des particules puisque de manière générale une augmentation atmosphérique des PM<sub>2.5</sub> est généralement associée à une augmentation des

PM<sub>10</sub> ou des PM<sub>0.1</sub>, il est donc difficile de différencier les effets inhérents à l'un ou l'autre type de particules. Pour observer des effets cancérigènes moléculaires et phénotypiques plus marqués, il faudrait peut être combiner les différents types de particules. Enfin, pour évaluer si les PM<sub>2.5</sub> représentent un facteur aggravant des cancers pulmonaires, nous pourrions envisager un modèle d'exposition des particules avec un cancérigène avéré dont le tabac.



# **BIBLIOGRAPHIE**





Abbas, I. *et al.* Air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol In vitro*. **2**, 37-46 (2009).

Abbas, I. *et al.* In vitro short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub>-0.3 induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Env Res*. **147**, 146-158 (2016).

Abbas, I. *et al.* Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub>. *Chem Biol Interact*. **188**, 558-565 (2010).

Abbas, I. *et al.* Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM<sub>2.5</sub>. *Chem Biol Interact*. **188**, 558-565 (2010).

Abbas, I. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J Appl Toxicol*. **33**, 109-119 (2013).

Adachi, K and Tainosho, Y. Characterization of heavy metal particles embedded in tire dust. *Environment International*. **30**, 1009- 1017 (2004).

ADEME, emissions de particules des vehicules routiers. novembre 2012.

AIRPARIF., origine des particules en ile-de-france septembre (2011).

Akira, T. *et al.* Butler Particle transport and deposition: basic physics of particle kinetics. *Compr Physiol*. 2013 3(4): 1437-1471. doi:10.1002/cphy.c100085.

Alberg, AJ. *et al.* Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. **132(3 Suppl)**, 29S-55S (2007).

Albuquerque-Silva, I. *et al.* Particle deposition in a child respiratory tract model: in vivo regional deposition of fine and ultrafine aerosols in baboons. *PLoS One*. **30;9(4)**, e95456 (2014).

Allen, AG. *et al.* Size Distributions of Trace Metals in Atmospheric Aerosols in the United Kingdom. *Atmos. Environ*. **35**, 4581-4591 (2001).

Allis, CD and Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*. **17**, 487-500 (2016).

Almeida, J. *et al.* Molecular understanding of sulphuric acid amine particle nucleation in the atmosphere. *Nature*. **502**, 359-363 (2013).

Ameres, SL. *et al.* Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. **130**,101-12 (2007).

Amil, N. *et al.* Seasonal variability of PM<sub>2.5</sub> composition and sources in the Klang Valley urban-industrial environment. *Atmo. Chem Phys*. **16**, 5357-5381 (2016).

Analitis, A. *et al.* Short-Term Effects of Ambient Particles on Cardiovascular and Respiratory Mortality. *Epidemiology*. **17(2)**, 230-233 (2006).

Anderson, DR. *et al.* Ultrafine characterization of emission and impact of ultrafine particulate. Research Fund for Coal and Steel; European Commission, 195p (2009).

Anderson, HR. *et al.* Ambient particulate matter and health effects: Publication bias in studies of short-term associations. *Epidemiology*. **16(2)**, 155-163 (2005).

Anderson, HR. *et al.* Particulate matter and daily mortality and hospital admissions in the west midlands conurbation of the United Kingdom: associations with fine and coarse particles, black smoke and sulphate. *Occup Environ Med*. **58(8)**, 504-10 (2001).

Andrade, MF. *et al.* Vehicle emissions and PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual. Atmos. Health*. **5**, 79-88 (2012).

Andre, V. *et al.* Mutagenicity and genotoxicity of PM<sub>2.5</sub> issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J. Appl.Toxicol*. **31(2)**, 131-138 (2011).

Apeayei, E. *et al.* Distribution of heavy metals in road dust along an urban-rural gradient in Massachusetts. *Atmos Environ*. **45**, 2310-232 (2011).

Arimoto, R. *et al.* Trace elements in the atmosphere over the North Atlantic. *J. Geophys. Res*. **100**, 1199-1213 (1995).

Aust, AE. *et al.* Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Res Rep Health Eff Inst*. **1**, 65 (2002).

Baccarelli, A. *et al.* Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med*. **179**, 572-578 (2009).

Bacon, K. *et al.* Induction of in vitro human lym- phocyte migration by interleukin 3, interleukin 4, and inter- leukin 6. *Cytokine*. **2**, 100-105 (1990).

Baldauf, A. *et al.* Performance of the portable MiniVol particulate sampler. *Atmospher. Env*. **35**, 6087-6091 (2001).

Barouki, R and Morel, Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol*. **61**, 511-6 (2001).

Bates, TS. *et al.* Layer aerosol chemistry during TexAQS/ GoMACCS 2006: Insights into aerosol sources and transformation processes. *J. Geophys. Res*. **113**, D00F01 (2008).

Baulig, A. *et al.* Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol in Vitro*. **17**, 567-573 (2003).

Baulig, A. *et al.* Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ Sci Technol*. **38(22)**, 5985-92 (2004).

Becker, S. *et al.* Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res*. **29**, 29-44 (2003).

Becker, S. *et al.* Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol*. **41**, 637- 48 (1996).

Beckett, WS. *et al.* Comparing inhaled ultrafine versus fine zinc oxide particles in healthy adults: a human inhalation study. *Am J Respir Crit Care Med*. **171**, 1129 -1135 (2005).

Beelen, R. *et al.* Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet*. **383**, 785e795 (2013).

Beeston, MP. *et al.* Characterization of artificially generated PbS aerosols and their use within a respiratory bioaccessibility test. *The Royal Society of Chemistry*. **135**, 351–357 (2009).

Beischlag, TV. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. **18**, 207–250 (2008).

Bell, ML. Assessment of the health impacts of particulate matter characteristics. Research report no. 161. Boston, MA: Health Effects Institute (2012).

Bell, ML. *et al.* Hospital admissions and chemical composition of fine particle air pollution. *Am J Respir Crit Care Med*. **179**, 1115–20 (2009).

Bell, ML. *et al.* Retrospective assessment of mortality from the London Smog Episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ. Health Perspect*. **112**(1), 6–8 (2004).

Bellen, R. *et al.* Long-term exposure to traffic-related air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology*. **19**, 702–710 (2008).

Benson, DR. *et al.* Ternary homogeneous nucleation of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>O under conditions relevant to the lower troposphere. *Atmospheric Chemistry and Physics*. **11**, 4755–4766 (2011).

Bergbäck, B. *et al.* K. Urban metal flows, a case study of Stockholm. *Water, Air, and Soil Pollution*. **1**, 3–24 (2000).

Bérubé, KA. *et al.* Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*. **278**, 311–318 (2010).

Bikkas, M. *et al.* Fractionation of elements by particle size and chemical bonding from aerosols followed by ETAAS determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **16**, 74–81 (2001).

Billet, S. *et al.* Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ Res*. **105**, 212–223 (2007).

Billet, S. *et al.* Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett*. **270**, 144–155 (2008).

Billet, S. *et al.* Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett*. **270**, 144–155 (2008).

Binkova, B. *et al.* Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000–2001. *Mutat. Res*. **525**, 43–59 (2003).

Birmili, W. *et al.* Trace Metal Concentrations and Water Solubility in Size-Fractionated Atmospheric Particles and Influence of Road Traffic. *Environ. Sci. Technol*. **40**, 1144–1153 (2006).

Blackburn, EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. **350**, 569–573 (1991).

Bloss, W. Atmospheric chemical processes of importance in cities. In: Hester, R.E., Harrison, R.M. (Eds.), Air quality in urban environments. Issues in Environmental Science and Technology, vol. 28. Royal Society of Chemistry, London, pp. 42e64 (2009).

Boeri, M. *et al.* MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(9), 3713–3718 (2011).

Boisa, N. *et al.* Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the fraction of soil. *Environ. Int*. **70**, 132–142 (2014).

Bond, TC. *et al.* Historical emissions of black and organic carbon aerosol from energy-related combustion, 1850–2000. *Glob. Biogeochem. Cyc*. **21**, GB2018 (2007).

Boublil, L. *et al.* Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in vitro*. **27**, 533e542 (2013).

Bozkus, F. *et al.* Serum telomerase levels and COPD exacerbations. *Respir Care*. **61**(3), 359–365 (2016).

Brauer, M. *et al.* Air pollution and retained particles in the lung. *Environ Health Perspect*. **109**(10), 1039–1043 (2001).

Bredberg, A. *et al.* Exhaled endogenous particles contain lung proteins. *Clin Chem*. **58**, 431–40 (2012).

Brena, RM and Costello, JF. Genome-epigenome interactions in cancer. *Hum Mol Genet*. **16**, 96–105 (2007);

Brock, MV. *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. **358**, 1118–28 (2008).

Brook, RD. *et al.* Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation*. **105**, 1534–6 (2002).

Brook, RD. *et al.* Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. **121**, 2331–2378 (2010).

Bruijne, K. *et al.* Design and testing of Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES): An alternative exposure system for particles. *Inhal. Toxicol*. **21**, 91–101 (2009).

Brunekreef, B and Holgate, ST. Air pollution and health. *Lancet*. **360**, 1233–1242 (2002).

Brunekreef, B. *et al.* Effects of long-term exposure to traffic-related air pollution on respiratory and cardiovascular mortality in the Netherlands: the NLCS-AIR study. *Res. Rep. Health Eff. Inst*. **5**, 71 (2009).

Burgel, PR. *et al.* Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev*. **20**, 7–22 (2011).

Burnett, RT. *et al.* Association between particulate and gas-phase components in urban air pollution and daily mortality in eight Canadian cities. *Inhal Toxicol*. **12**, 52–62 (2000).

Buschini, A. *et al.* Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere*. **44**(8), 1723–36 (2001).

Buseck, PR and Adachi, K. Nanoparticles in the atmosphere. *Elements*. **4**, 389–394 (2008).

Caboche, J. *et al.* Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *J Environ Monit.* **13**(3), 621-30 (2011).

Canepari, S. *et al.* Determination of metals, metalloids and non-volatile ions in airborne particulate matter by a new two-step sequential leaching procedure Part A: Experimental design and optimization. *Talanta.* **69**, 581–587 (2006).

Carney, DN and Minna, JD. Small cell cancer of the lung. *Clin. Chest Med.* **3**, 389–398 (1982).

CFHA (Commission Fédérale de l'Hygiène de l'Air). Les poussières fines en Suisse. Rapport de la CFHA, Berne - 2007: 144 p.

Chan, CC. *et al.* Urban air pollution and emergency admissions for cerebrovascular diseases in Taipei, Taiwan. *Eur Heart J.* **27**(10), 1238–44 (2006).

Chan, TA. *et al.* Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. *PLoS Med.* **5**, 114 (2008).

Chen, H. *et al.* Long-term exposure to traffic-related air pollution and cardiovascular mortality. *Epidemiology.* **24**, 35-43 (2013).

Chen, J and Griffin, RJ. Modeling secondary organic aerosol formation from oxidation of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, and d-limonene. *Atmospheric Environment.* **39**(40), 7731-7744 (2005).

Cheng, EH. *et al.* VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science.* **301**, 513-517 (2003).

Cheng, MD. *et al.* Monitoring cellular responses of engine-emitted particles by using a direct air-cell interface deposition technique. *Chemosphere.* **53**(3), 237–43 (2003).

Cheng, Q. *et al.* ATM activates P53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *EMBO J.* **28**(24), 3857–3867 (2009).

Cheng, Y. *et al.* Chemically-specified on-road PM<sub>2.5</sub> motor vehicle emission factors in Hong Kong. *Science of the total environment.* **408**, 1621-1627 (2010).

Chervona, Y and Costa, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res.* **2**, 589-597 (2012).

Cho, AK. *et al.* Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environ Res.* **99**, 40-47 (2005).

Chow, JC. PM<sub>2.5</sub> source profiles for black and organic carbon emission inventories, *Atmospheric Environment.* **45**, 5407-5414 (2011).

Chung, KF and Adcock, IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J.* **31**(6), 1334-56. (2008)

Chung, Y. *et al.* Associations between long-term exposure to chemical constituents of fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and mortality in Medicare enrollees in the eastern United States. *Environ Health Perspect.* **123**(5), 467-74 (2015).

Churg, A. *et al.* Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect.* **111**(5), 714–718 (2003).

Cifuentes, L. *et al.* Effect of the fine fraction of particulate matter versus the coarse mass and other pollutants on daily mortality in Santiago, Chile. *J Air Waste Manag Assoc.* **50**, 1287–1298 (2000).

CIRC Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manu/acturing Industry. CIRC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, vol 58: 1-444 (1993).

CIRC, Les causes du cancer en France, (2010).

CIRC, Stewart, BW and Wild, CP. World cancer report, (2014).

CIRC. Chromium, Nickel and Welding. CIRC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, vol 49: 1-677 (1990).

CIRC. launches the definitive cancer statistics resource GLOBOCAN 2008 PRESS RELEASE N° 201 (2010).

CIRC. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of CIRC Monographs Volumes 1 to 42. CIRC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, supplement 7 (1987).

CIRC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. CIRC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 92: 1–853 (2010).

CITEPA / FORMAT SECTEN – Avril 2013

Clare, LS. *et al.* Characterizing metal(loid) solubility in airborne PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub> in Frankfurt, Germany using simulated lung fluids. *Atmospheric Environment.* **89**, 282-289 (2014).

Claxton, LD and Woodall, GM. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res-Rev Mutat.* **636**, 36–94 (2007).

Claxton, LD. *et al.* A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension Salmonella mutagenicity assays. *Sci Total Environ.* **275**(1–3), 95–108 (2001).

Clouter, A. *et al.* Inflammatory effects of respirable quartz collected in workplaces versus standard DQ12 quartz:particle surface correlates. *Toxicological Science.* **63**, 90-98 (2001).

Cohen, AJ. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect.* **108** (Suppl 4), 743-50 (2000).

Cohen, BS and McCammon, CS. Air sampling instruments for evaluation of atmospheric contaminants. 9th Edn. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 135-148 (2001).

Coller, HA. Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol.* **184**(1), 4-17 (2014).

Colombo, C. *et al.* Plant. Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **71**, 722–730 (2008).

Correia, AW. *et al.* Effect of air pollution control on life expectancy in the United States. *Epidemiology.* **24**, 23–31 (2013).

Costa, DL and Dreher, KL. Bioavailable Transition Metals in Particulate Matter Mediate Cardiopulmonary Injury in Healthy and Compromised Animal Models. *Environ Health Perspect.* **105**(Suppl 5), 1053–1060 (1997).

Costea, D. *et al.* Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol.* **121**, 1479–1486 (2003).

Cotter, TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer.* **9(7)**, 501-7 (2009).

Councell, TB. *et al.* Tire-wear particles as a source of zinc to the environment. *Environ Sci Technol.* **38(15)**, 4206-4214 (2004).

Crouse, DL. *et al.* A New Method to Jointly Estimate the Mortality Risk of Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter and its Components. *Sci Rep.* **6**, 18916 (2016).

Crouse, DL. *et al.* Risk of non-accidental and cardiovascular mortality in relation to long-term exposure to low concentrations of fine particulate matter: a Canadian national-level cohort study. *Environ Health Perspect.* **120**, 708–714 (2012).

Crystal, RG. *et al.* Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc.* **5**, 772–777 (2008).

Dachs, J and Eisenreich, SJ. Adsorption onto Aerosol Soot Carbon Dominates Gas-Particle Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3690–3697 (2000).

Dagher, Z. *et al.* Activation of different pathways of apoptosis by Dunkerque city air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology.* **225**, 12-24 (2006).

Dagher, Z. *et al.* Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol.* **25**, 166-175 (2005).

Dagher, Z. *et al.* Role of Nuclear Factor-kappa B Activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM<sub>25</sub>) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol.* **27**, 284-290 (2007).

Dalle-Donne, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* **329**, 23–38 (2003).

Damiani, LA. *et al.* Carcinogen-induced gene promoter hypermethylation is mediated by DNMT1 and causal for transformation of immortalized bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* **68**, 9005-14 (2008).

Darquenne, C. Aerosol Deposition in Health and Disease. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery.* **25**, 3 (2012).

Daskalos, A. *et al.* Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* **124**, 81-7 (2009).

Davies, DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* **6**, 678-682 (2009).

Davies, NM and Feddah, MR. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *Int. J. Pharm.* **255**, 175–187 (2003).

Davis, AP. *et al.* Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere.* **44**, 997-1009 (2001).

De Brito, KC. *et al.* Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* **94**, 14-20 (2013).

De Martinis, BS. *et al.* Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from São Paulo, Brazil. *Mutat Res.* **446(1)**, 83–94 (1999).

Delmas, R. *et al.* Physique et chimie de l’atmosphère. Edition-BERLIN, France, 639 p. (2005).

Deng, F. *et al.* Effects of dust storm PM<sub>2.5</sub> on cell proliferation and cell cycle in human lung fibroblasts. *Toxicol In Vitro.* **4**, 632-8 (2007).

Deng, X. *et al.* PM<sub>2.5</sub> induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol.* **29(3)**, 143-57 (2013).

DeNicola, GM. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature.* **475(7354)**, 106-9 (2011).

Dergham, M. *et al.* Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5-0.3</sub>) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* **25(4)**, 904–919 (2012).

Dergham, M. *et al.* Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate matter (PM<sub>0.3-2.5</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Env Res.* **137**, 256-267 (2015).

Despres, VR. *et al.* Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus Series B - Chemical and Physical Meteorology.* **64**, 15598 (2012).

Devlin, RB, *et al.* In vitro studies: What is their role in toxicology? *Exper. Toxicol. Pathol.* **57**, 183-188 (2005).

Diamond, G. *et al.* The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* **173**, 27–38 (2000).

Dieme, D. *et al.* Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) collected in Dakar city (Senegal). *Environ. Res.* **113**, 1–13 (2012).

Doherty, SP. *et al.* Detection of changes in alveolar macrophage iron status induced by select PM<sub>2.5</sub>-associated components using iron-response protein binding activity. *Inhal. Toxicol.* **19(6–7)**, 553–562 (2007).

Dominici, F. *et al.* Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA.* **295(10)**, 1127–34 (2006).

Dominici, F. *et al.* National maps of the effects of particulate matter on mortality: exploring geographical variation. *Environ. Health Perspect.* **111**, 39–43 (2003).

Donaldson, K. *et al.* Ambient Particle Inhalation and the Cardiovascular System: Potential Mechanisms. *Environ Health Perspect.* **109(Suppl 4)**, 523–527 (2001).

Donaldson, K. *et al.* Deposition and effects of fine and ultrafine particles in the respiratory tract. *Eur. Respir. Monogr.* **21**, 77–92 (2002).

Donaldson, K. *et al.* Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury. *Journal of Aerosol Science.* **29**, 553-560 (1998).

Dongarrà, G. *et al.* Possible markers of traffic-related emissions. *Environmental Monitoring and Assessment*. **154**, 117-125 (2009).

Donnem, T. *et al.* MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer. *PLoS One*, **7(1)**, e29671 (2012).

Dos Santos, M. *et al.* Determination of water-soluble and insoluble compounds in size classified airborne particulate matter. *Microchemical Journal*. **9**, 133–139 (2009).

Dreher, D and Junod, AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer*. **32A**, 30–8 (1996).

Duan, H. *et al.* MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol In Vitro*. **24**, 928–935 (2010).

Dubowsky, SD. *et al.* Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environ. Health Persp.* **114**, 992-998 (2006).

Durham, AL and Adcock, IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer*. **90**, 121–127 (2015).

Dutt, A and Wong, KK. Mouse Models of Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. **12**, 4396s-4402s (2006).

Dvorak, A. *et al.* Airway Epithelium Air– Liquid Cultures Represent the In Vivo Airway Epithelium Transcriptome? *Am J Respir Cell Mol Biol*. **44**, 465–473 (2011).

Dysart, MM. *et al.* Environmental particulate (PM2.5) augments stiffness- induced alveolar epithelial cell mechanoactivation of transforming growth factor beta. *PLoS One*. **9(9)**, e106821 (2014).

EEA. Air quality in Europe. 2013 report.

Egger, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. **429**, 457-63 (2004).

El Yamani, M. Pollution atmosphérique urbaine. AFSSET (juin 2006).

EPA. Primary Particles Generated by the Combustion of Heavy Fuel Oil and Coal Review of Research Results from EPA's National Risk Management Research Laboratory

Evans, J. *et al.* Estimates of global mortality attributable to particulate air pollution using satellite imagery. *Environ. Res*. **120**, 33–42 (2013).

Fajersztajn, L. *et al.* Airpollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **13**, 674–678 (2013).

Falta, T. *et al.* Bioaccessibility of selected trace metals in urban PM 2.5 and PM 10 samples: a model study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **390**, 1149–1157 (2008).

Fang, GC. *et al.* The study of fine and coarse particles, and metallic elements for the daytime and night-time in a suburban area of central Taiwan, Taichung. *Chemosphere*. **41**, 639–644 (2000).

Faustini, A. *et al.* Short-term effects of air pollution in a cohort of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Epidemiology*. **23(6)**, 861–879 (2012).

Fenger, J. Air pollution in the last 50 years - from local to global. *Atmospheric Environment*. **43(1)**, 13–22 (2009).

Ferecatu, I. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Part Fibre Toxicol*. **21**, 7:18 (2010).

Fernández-Camacho, R. *et al.* Ultrafine particle and fine trace metal (As, Cd, Cu, Pb and Zn) pollution episodes induced by industrial emissions in Huelva, SW Spain. *Atmos. Environ*. **61**, 507-517 (2012).

Fernandez-Espinosa, AJ. *et al.* A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmospheric Environment*. **36**, 773–780 (2002).

Fernandez-Espinosa, AJ. *et al.* An approach to characterization of sources of urban airborne particles through heavy metal speciation. *Chemosphere - Global Change Science*. **2**, 123-136 (2000).

Fernandez-Espinosa, AJ. *et al.* Size distribution of metals in urban aerosols in Seville (Spain). *Atmospheric Environment*. **35**, 2595-2601 (2001).

Fernandez-Garcia, I. *et al.* Telomeres and telomerase in lung cancer. *J Thorac Oncol*. **3(10)**, 1085-8 (2008).

Fernández-Marcelo, T. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *J Exp Clin Cancer Res*. **34(1)**, 78 (2015).

Filipic, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res* **733**, 69-77 (2012).

Frampton, MW. *et al.* Effects of aqueous extracts of PM10 filters from the Utah Valley on human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol*. **277**, 960–967 (1999).

Franco, R. *et al.* Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: manage a trois. *Mutat Res*. **674**, 3-22 (2009).

Franklin, M. *et al.* Associations between PM2.5 and all- cause and specific-cause mortality in 27 US communities. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. **17**, 279–287(2007).

Franklin, M. *et al.* The role of particle composition on the association between PM2.5 and mortality. *Epidemiology*. **19**, 680–9 (2008).

Freishtat, RJ. *et al.* Asthmatic airway epithelium is intrinsically inflammatory and mitotically dyssynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **44**, 863-869 (2011).

Fukuzaki, N. *et al.* Effects of studded tires on road-side airborne dust pollution in Niigata, Japan. *Atmos Environ*. **20**, 377–86 (1986).

Gallagher, JT and Richardson, PS. Respiratory mucus: structure, metabolism and control of secretion. In: Chantler EN, Elder JJB, Elstein M, eds. Mucus in Health and Disease. New York, Plenum Press, pp. 335–350 (1982).

Gamble, JL. Chemical Anatomy, Physiology, and Pathology of Extracellular Fluid: A Lecture Syllabus. 6th Ed. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1942, 164 p.

Garçon, G. *et al.* Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol. In Vitro*. **20**, 519–528 (2006).

Garshick, E. *et al.* Lung cancer and elemental carbon exposure in trucking industry workers. *Environ. Health Perspect.* **120**, 1301–1306 (2012).

Gautheron, DC. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review. *J Inherit Metab Dis.* **7** (Suppl 1), 57–61 (1984).

Gavett, SH. *et al.* Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. *Environ Res.* **72**(2), 162–172 (1997).

Gehling, W and Dellinger, B. Environmentally persistent free radicals and their lifetimes in PM<sub>2.5</sub>. *Environ. Sci. Technol.* **47**(15), 8172–8178 (2013).

Gehling, W. *et al.* Hydroxyl radical generation from environmentally persistent free radicals (EPFRs) in PM<sub>2.5</sub>. *Environ. Sci. Technol.* **48**(8), 4266–4272 (2014).

Gertler, AW *et al.* An assessment of the mobile source contribution to PM<sub>10</sub> and PM<sub>25</sub> in the United States. *Water Air Soil Pollut.* **123**, 203–214 (2000).

Ghio, AJ. *et al.* Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 981–988 (2000).

Ghio, AJ. *et al.* Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Particle and Fibre Toxicology.* **10**, 25 (2013).

Gietl, JK. *et al.* Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment.* **44**, 141–146 (2010).

Godoy, DP. *et al.* Aerosol source apportionment around a large coal fired power plant-Thermoelectric Complex Jorge Lacerda, Santa Catarina, Brazil. *Atmospheric environment.* **39**(29), 5307–5324 (2005).

Goerke, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1408**, 79–89 (1998).

Goix, S. *et al.* Metal concentration and bioaccessibility in different particle sizes of dust and aerosols to refine metal exposure assessment. *J. Hazard Mater.* **317**, 552–562 (2016).

GOLD. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2015).

Grahame, TJ and Schlesinger, RB. Oxidative stress-induced telomeric erosion as a mechanism underlying airborne particulate matter-related cardiovascular disease. *Part Fibre Toxicol.* **19**, 9:21 (2012).

Gravellier, A. Biodisponibilité des métaux dans les sols et impact dans la sa prise en compte dans l'évaluation des risque sanitaire. Mémoire de fin d'étude d'ingénieur de génie sanitaire, Ecole Nationale de Santé Publique – Rennes: 109 p (2007)..

Gray, JE. *et al.* In Vitro Studies Evaluating Leaching of Mercury from Mine Waste Calcine Using Simulated Human Body Fluids. *Environmental Science and Technology.* **44**, 4782–4788 (2010).

Gray, TE. *et al.* Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **14**, 104–112(1996).

Grieshop, AP. *et al.* Fine particle emission factors from vehicles in a highway tunnel: Effects of fleet composition and season. *Atmos. Environ.* **40**, 287–298 (2006).

Grollman, AP and Moriya, M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* **9**, 246–249 (1993).

Groneberg, DA. *et al.* Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung. *Respir Med.* **96**(2), 81–6 (2002).

Gross, DS. *et al.* Single particle characterization of automobile and diesel truck emissions in the Caldecott tunnel. *Aerosol Sci. Technol.* **32**, 152–163 (2000).

Gualtieri, M. *et al.* Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro.* **24**, 29–39 (2010).

Gualtieri, M. *et al.* Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: effects on DNA, mitochondria, AHR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* **713**(1–2), 18–31 (2011).

Guerzoni, S. *et al.* Saharan dust inputs to the western Mediterranean sea: depositional pattern, geochemistry and sedimentological implications. *Atmospheric Environment.* **44**, 631–654 (1997).

Gugamsetty, B. *et al.* Source Characterization and Apportionment of PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>0.1</sub> by Using Positive Matrix Factorization. *Aerosol and Air Quality Research.* **12**, 476–491 (2012).

Guney, M. *et al.* Lung bioaccessibility of contaminants in particulate matter of geological origin. *Environ Sci Pollut Res Int.* (2016).

Gutiérrez-Castillo, ME. *et al.* Chemical characterization of extractable water soluble matter associated with PM<sub>10</sub> from Mexico City during 2000. *Chemosphere.* **61**, 701–710 (2005).

Halonen, JI. *et al.* Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly. *Epidemiology.* **20**(1), 143–53 (2009).

Halonen, JI. *et al.* Urban air pollution, and asthma and COPD hospital emergency room visits. *Thorax.* **63**(7), 635–41 (2008).

Hamel, SC. *et al.* Bioaccessibility of metals in soils for different liquid to solid ratios in synthetic gastric fluid. *Environ Sci Technol.* **32**, 358 (1998).

Hamm, H. *et al.* The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Investig.* **70**, 637–657 (1992).

Hamra, GB. *et al.* Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* **122**, 906e911 (2014).

Han, JS. *et al.* Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature.* **429**, 268–274 (2004).

Han, NMM. *et al.* Composition of selected heavy metals in road dust from Kuala Lumpur city centre. *Environ Earth Sci.* **72**, 849 (2013).

Hanahan, D and Weinberg, RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**, 646–674 (2011).

Hanahan, D and Weinberg, RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. **100(1)**, 57-70 (2000).

Hand, JL. *et al.* Seasonal composition of remote and urban fine particulate matter in the United States. *J. Geophys. Res.: Atmos.* **117**, D05209 (2012).

Harrison, RM and Perry, R. Handbook of Air Pollution Analysis, 2nd Edition. Chapman & Hall, London, pp. 247–271 (1986).

Hartzog, GA and Winston, F. Nucleosomes and transcription: recent lessons from genetics. *Curr Opin Genet Dev.* **7**, 192-8 (1997).

Hayami, S. *et al.* Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol Cancer.* **9**, 59 (2010).

Heal, MR. *et al.* Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmospheric Environment.* **39**, 1417–1430 (2005).

Hellmann, GM. *et al.* Gene Expression Profiling of Cultured Human Bronchial Epithelial and Lung Carcinoma Cells. *Toxicol Sci.* **61(1)**, 154-63 (2001).

Herbst, RS and Langer, CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: The emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancer. *Semin Oncol.* **29**, 27 36 (2002).

Herczeg, Z and Vaissière, T. Epigenetic mechanisms and cancer. An interface between the environment and the genome. *Epigenetics.* **6:7**, 804-819 (2011).

Hetem, IG and Andrade, MF. Characterization of Fine Particulate Matter Emitted from the Resuspension of Road and Pavement Dust in the Metropolitan Area of São Paulo, Brazil. *Atmosphere.* **7**, 31 (2016).

Heyder, J. *et al.* Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.0005-15µm. *J Aerosol Sci.* **17**, 811–825 (1986).

Hiura, TS. *et al.* The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J Immunol.* **165**, 2703–2711 (1996).

Hochedlinger, K and Jaenisch, R. Induced pluripotency and epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 7-12 (2015).

Hodzic, A. *et al.* Aerosol chemical and optical properties over the Paris area within ESQUIF project. *Atmospheric Chemistry and Physics.* **6**, 3257-3280 (2006).

Hoek, G. *et al.* Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review. *Environ Health.* **12**, 43 (2013).

Horvath, H. *et al.* The Size Distribution and Composition of the Atmospheric Aerosol at a Rural and Nearby Urban Location. *J. Aerosol Sci.* **27**, 417-435 (1996).

Hou, L. *et al.* Environmental chemicals and microRNAs. *Mutation research.* **714**, 105-112 (2011).

Houben, JM. *et al.* Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* **103(2)**, 230-6 (2009).

Hougardy, BM. *et al.* Clinical potential of inhibitors of survival pathways and activators of apoptotic pathways in treatment of cervical cancer: changing the apoptotic balance. *Lancet Oncol.* **6(8)**, 589-98 (2005).

Hoxha, M. *et al.* Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers. *Environ Health.* **8**, 41 (2009).

Huang, M. *et al.* Arsenic speciation in total contents and bioaccessible fractions in atmospheric particles related to human intakes. *Environmental Pollution.* **188**, 37-44 (2014).

Huang, Q. *et al.* Effects of water soluble PM2.5 extracts exposure on human lung epithelial cells (A549): a proteomic study. *J. Appl. Toxicol.* (2013).

Huang, S. *et al.* Contribution of endotoxin in macrophage cytokine response to ambient particles in vitro. *J Toxicol Environ Health.* **65**, 1261-1272 (2002).

Huang, YC. *et al.* Comparison of gene expression profiles induced by coarse, fine, and ultrafine particulate matter. *J Toxicol Environ Health A.* **74**, 296–312 (2011).

Hunt, A. *et al.* Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. *Environ Health Perspect.* **111(9)**, 1209–1214 (2003).

Hussein, T. *et al.* Modal structure and spatial-temporal variations of urban and suburban aerosols in Helsinki—Finland. *Atmos. Environ.* **39**, 1655–1668 (2005).

Imrich, A. *et al.* Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* **159**, 117-124 (1999).

INCA, Epidemiologie des Cancers en France. <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers>

INSERM., Cancer et environnement. (2008)

Iskandar, AR. *et al.* Impact Assessment of Cigarette Smoke Exposure on Organotypic Bronchial Epithelial Tissue Cultures: A Comparison of Mono-Culture and Coculture Model Containing Fibroblasts. *Toxicol Sci.* **147(1)**, 207–221 (2015).

Jackson, SP and Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* **461**, 1071–1078 (2009).

Jaffrezo, JL. *et al.* Size distributions of atmospheric trace elements at dye 3, Greenland—II. Sources and transport *Atmospheric Environment.* **27,(17–18)**, 2803–2814 (1993).

Jalava, PI. *et al.* Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns. *Inhal Toxicol.* **19**, 213–225 (2007).

Jang, HN. *et al.* Formation of fine particles enriched by V and Ni from heavy oil combustion: anthropogenic sources and drop-tube furnace experiments. *Atmos. Environ.* **41**, 1053–1063 (2007).

Jardim, JE. microRNAs: Implications for air pollution research. *Mutation Res.* **717**, 38-45. (2011).

Jardim, MJ. *et al.* Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environ Health Perspect.* **117**, 1745-51 (2009).



Jeong, HC. *et al.* Receptor model based identification of PM<sub>2.5</sub> sources in Canadian cities. *Atmospheric Pollution Research*. **2**, 158–171 (2011).

Ji, H and Hershey, GK. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol*. **129**, 33–41 (2012).

Johansson, C. *et al.* Road traffic emission factors for heavy metal. *Atmospheric Environment*. **43(31)**, 4681–4688 (2009).

Johnston, MV and Wexler, AS. Mass spectrometry of individual aerosol particles. *Anal. Chem*. **67**, 721–762 (1995).

Jones, PA and Baylin, SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. **3**, 415–428 (2002).

Juhász, AL. *et al.* Evaluation of SBRC-Gastric and SBRC-Intestinal Methods for the Prediction of In Vivo Relative Lead Bioavailability in Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*. **43**, 4503–4509 (2009).

Jung, J. *et al.* Simulating the size distribution and chemical composition of ultrafine particles during nucleation events, *Atmos. Environ*. **40**, 2248–2259 (2006).

Kadenbach, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. **1604(2)**, 77–94 (2003).

Kahn, MC. *et al.* Phosphatidylcholine molecular species of calf lung surfactant. *Am. J. Physiol*. **269**, 567–573 (1995).

Kanapilly, GM. *et al.* Measurement of in vitro dissolution of aerosol particles for comparison to in vivo dissolution in the lower respiratory tract after inhalation. *Health Phys*. **24**, 497–507 (1973).

Kang, K.W. *et al.* Molecular mechanism of Nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. **7**, 1664–1673 (2005).

Kantanoda, K. *et al.* An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J. Epidemiol*. **21**, 132–143 (2011).

Karlsson, H.L. *et al.* 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 (2004).

Karlsson, H.L. *et al.* Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles – Importance of the metal release process. *Toxicology*. **313**, 59–69 (2013).

Karmacharya, N and Shakya, P.R. Heavy metals in bulk and particle size fractions from street dust of Kathmandu as the possible basis for risk assessment. *Sci World*. **10(10)**, 84–88 (2012).

Karthikeyan, S. *et al.* Particulate air pollution from bushfires: human exposure and possible health effects. *J. Toxicol. Environ. Health A*. **69**, 1895–1908 (2006).

Katsouyanni, K. *et al.* Short-term effects of air pollution on health: a European approach using epidemiologic time-series data: the APHEA protocol. *J Epidemiol Community Health*. **50(suppl 1)**, S12–S18 (1996).

Keatings, VM. *et al.* Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. **153(2)**, 530–4 (1996).

Kelly, F.J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med*. **60**, 612–616 (2003).

Kesimer, M. *et al.* Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **296**, 92–100 (2009).

Kim, W. *et al.* Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation. *J Biol Chem*. **287(8)**, 5588–99 (2012).

Kirkby, J. *et al.* Role of sulphuric acid, ammonia and galactic cosmic rays in atmospheric aerosol nucleation. *Nature*. **476**, 429–433 (2011).

Kleinman, MT. *et al.* Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *Inhal Toxicol*. **19 Suppl 1**, 117–26 (2007).

Klemm, RJ and Mason, R. Replication of reanalysis of Harvard Six-City Mortality Study. In Revised analyses of time-series of air pollution and health. Special report, pp. 165–172. Boston: Health Effects Institute.

Knaapen, AM. *et al.* Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int. J. Cancer*. **109**, 799–809 (2004).

Knaapen, AM. *et al.* Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem*. **234-235(1-2)**, 317–26 (2002).

Kodavanti, UP. *et al.* Acute lung injury from intratracheal exposure to fugitive residual oil fly ash and its constituent metals in normo- and spontaneously hypertensive rats. *Inhal Toxicol*. **13**, 37–54 (2001).

Koren, HS. Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect*. **103(suppl 6)**, 235–242 (1995).

Kosaka, T. *et al.* Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*. **64**, 8919–8923 (2004).

Kothai, P. *et al.* Source Apportionment of Coarse and Fine Particulate Matter at Navi Mumbai, India. *Aerosol Air Qual. Res*. **8**, 423–436 (2008).

Krook, J. *et al.* Metal contamination in recovered waste wood used as energy source in Sweden. *Resour. Conserv. Recycl*. **41(1)**, 1–14 (2004).

Kundu, S and Stone, EA. Composition and sources of fine particulate matter across urban and rural sites in the Midwestern United States. *Environ Sci Process Impacts*. **16(6)**, 1360–1370 (2014).

Kung, T. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor (AHR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochem Pharmacol*. **77(4)**, 536–546 (2009).

Kunii, O. *et al.* The 1997 haze disaster in Indonesia: its air quality and health effects. *Arch. Environ. Health*. **57**, 16–22 (2002).

Künzli, N. *et al.* Comparison of oxidative properties, light absorbance, total and elemental mass concentration of ambient PM<sub>2.5</sub> collected at 20 European sites. *Environ Health Perspect*. **114(5)**, 684–90 (2006).

Kurup, V. *et al.* Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. **129(3)**, 181–8 (2002).

Kyotani, T. *et al.* Characterization of soluble and insoluble components in PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> fractions of airborne particulate matter in Kofu city, Japan. *Atmospheric Environment*. **36**, 639–649 (2002).

Laden, F. *et al.* Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six US cities. *Environ Health Perspect*. **108**, 941–947 (2000).

Laden, F. *et al.* 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 (2006).

Lappalainen, U. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  causes pulmonary inflammation, emphysema, and air-way remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **32**, 311–318 (2005).

Le Tertre, A. *et al.* Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities. *J Epidemiol Community Health*. **56(10)**, 773–9 (2002).

Leclercq, B. *et al.* Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM<sub>4</sub>. *Environ Pollut*. **218**, 1074–1088 (2016).

Legret, M and Pegotto, C. Evaluation of pollutant loadings in the runoff waters from a major rural highway. *The Science of the Total Environment*. **235**, 143–150 (1999a).

Lenz, AG. *et al.* A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. **16**, 6:32 (2009).

Lepers, C. *et al.* Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA adducts generated by particulate matter pollution in BEAS-2B cell line: geographical and seasonal influence. *J. Appl. Toxicol*. **34 (6)**, 703e713 (2014).

Lerner, CA. *et al.* Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammation and COPD. *Int J Biochem Cell Biol* doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.026 (2016)

Lewis, ER and Schwartz, SE. Sea Salt Aerosol Production: Mechanisms, Methods, Measurements, and Models. Washington, DC: American Geophysical Union (2004).

Li, M. *et al.* Short term exposure to ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) increases hospitalizations and mortality of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Chest*. **149(2)**, 447–58 (2016).

Li, N. *et al.* Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol*. **173**, 3467–81 (2004).

Li, N. *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Persp*. **111**, 455–460 (2003).

Li, X. *et al.* Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *App Geochem*. **16(11–12)**, 1361–1368 (2001).

Libby, P. Current concepts in the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. **104**, 365–72 (2001).

Lighty, J. *et al.* Combustion aerosols: Factors governing their size and composition and implications to human health. *J Air Waste Manage. Assoc*. **50(9)**, 1565–1618 (2000).

Lim, SS. *et al.* A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. **380**, 2224–2260 (2012).

Limbeck, A. *et al.* Determination of water soluble trace metals in airborne particulate matter using a dynamic extraction procedure with on-line inductively coupled plasma optical emission spectrometric detection. *Anal. Chim*. **750**, 111–119 (2012).

Ling, SH and van Eeden, SF. Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chronic Obstruct. Pulm. Dis*. **4**, 233–243 (2009).

Lippmann, M. *et al.* Cardiovascular effects of nickel in ambient air. *Environ Health Perspect*. **114**, 1662–9 (2006).

Lippmann, M. *et al.* Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *British Journal of industrial Medicine*. **37**, 337–362 (1980).

Liu, C. *et al.* Characterization of genome-wide H3K27ac profiles reveals a distinct PM<sub>2.5</sub>-associated histone modification signature. *Environ Health*. **15**; 14:65 (2015).

Liu, C. *et al.* Exposure to airborne PM<sub>2.5</sub> suppresses microRNA expression and deregulates target oncogenes that cause neoplastic transformation in NIH3T3 cells. *Oncotarget*. **6(30)**, 29428–39 (2015).

Llanos, S. *et al.* Stabilization of P53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*. **3(5)**, 445–52 (2001).

Lloyd, DR. *et al.* Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions. *Chem Res Toxicol*. **11**, 420–7 (1998).

Logan, WPD. Mortality in London fog incident, 1952. *Lancet*. **1**, 336–338 (1953).

Longhin, E. *et al.* Cell cycle alterations induced by urban PM<sub>2.5</sub> in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved. *Part Fibre Toxicol*. **19**, 10:63 (2013).

Loomis, D. *et al.* The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. **14**, 1262–3 (2013).

Loury, R and Sassone-Corsi, P. Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods*. **31**, 40–48 (2003).

Lu, X. *et al.* Contamination assessment of copper, lead, zinc, manganese and nickel in street dust of Baoji, NW China. *J Hazard Mat*. **161**, 1058–1062 (2009).

Lucas, AM and Douglas, LC. Principles underlying ciliary activity in the respiratory tract. II. A comparison of nasal clearance in man, monkey and other animals. *Arch Otolaryngol*. **20**, 518–541 (1934).

Madtes, DK. *et al.* Transforming growth factor-alpha deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. **20**, 924–934 (1999).

Mahowald, NM. *et al.* Atmospheric global dust cycle and iron inputs to the ocean. *Global Biogeochemical Cycles*. **19**, GB4025 (2005).

Malumbres, M and Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. **9(3)**, 153-66 (2009).

Manoli, E. *et al.* Chemical characterization and source identification/apportionment of fine and coarse air particles in Thessaloniki, Greece. *Atmos. Environ.* **36**, 949–961 (2002).

Marlowe, JL. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. **19**, 3263-3271 (2008).

Marnett, LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95 (1999).

Marnett, LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **21**, 361–70 (2000).

Marris, H. *et al.* Fast changes in chemical composition and size distribution of fine particles during the near-field transport of industrial plumes. *Science of The Total Environment*. **427-428**, 126-138 (2012).

Martinez-Zamudio, R. *et al.* Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*. **7**, 820-7 (2011).

Masella, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. **16**, 577–86 (2005).

Masoli, M. *et al.* The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. **59**, 469-78 (2004).

Matthwes, LW. *et al.* Studies on pulmonary secretions. i. the over-all chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am rev respir dis*. **88**, 199-204 (1963).

Mbengue, S. *et al.* Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmospheric Research*. **135–136**, 35–47 (2014).

McCracken, J. *et al.* Annual Ambient Black Carbon Associated with Shorter Telomeres in Elderly Men: Veterans Affairs Normative Aging Study. *Environ Health Perspect*. **118**, 1564–1570 (2010).

McGuire, A. *et al.* The excess cost of acute exacerbations of chronic bronchitis in patients aged 45 and older in England and Wales. *Value Health*. **4**, 370–375 (2001).

McMurry, PH. *et al.* Particles matter science for policy makers: A NARSTO Assessment, Cambridge University Press, Cambridge, 510 p (2004).

Mehta, AJ. *et al.* Long-Term Exposure to Ambient Fine Particulate Matter and Renal Function in Older Men: The VA Normative Aging Study. *Environ Health Perspect*. **24(9)**, 1353-60 (2016).

Méndez, LB. *et al.* Inhaled aerosol particle dosimetry in mice: a review. *Inhal Toxicol*. **22 (Suppl )2**, 15-20 (2010).

Meng, Z and Zhang, Q. Damage effects of dust storm PM2.5 on DNA in alveolar macrophages and lung cells of rats, *Food Chem. Toxicol*. **45**, 1368–1374 (2007).

Mercer, RR. *et al.* Alveolar septal structure in different species. *J Appl Physiol*. **77(3)**, 1060-6 (1994).

Meuwissen, R and Berns, A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev*. **19(6)**, 643-64 (2005).

Midander, K. *et al.* Elaboration of a test method for the study of metal release from stainless steel particles in artificial biological media. *Corrosion Science*. **48**, 2855–2866 (2006).

Miguel, AG. *et al.* Allergens in paved road dust and airborne particles. *Environmental Science and Technology*. **33**, 4159–4168 (1999).

Miller, KA. *et al.* Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med*. **356**, 447–458 (2007).

Mills, NL. *et al.* Ischemic and thrombotic effects of dilute diesel-exhaust inhalation in men with coronary heart disease. *New Eng J Med*. **357**, 1075–82 (2007).

Ministère de la santé publique et des solidarités. Programme d’actions en faveur de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 2005 – 2010 « Connaître, prévenir et mieux prendre en charge la BPCO ».

Mirivel, G. Développement de méthodes d’analyse de composés organiques dans les particules fines et étude de leur vieillissement en milieu contrôlé. Thèse de doctorat, l’Université des Sciences et Technologies de Lille, 287 p (2009).

Mitchell, PS. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci*. **105**, 10513-8 (2008).

Mitschik, S. *et al.* Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: A comparative analysis of published studies. *Inhal. Toxicol*. **20**, 399-414 (2008).

Miyanaga, A. *et al.* Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. *Mol Cancer Ther*. **7**, 1923-30 (2008).

Monn, C and Becker, S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol*. **155**, 245-252 (1999).

Morales, AH. *et al.* Quantitative structure activity relationship for the computational prediction of nitrocompounds carcinogenicity. *Toxicology*. **220(1)**, 51–62 (2006).

Morawska, L and Zhang, J. Combustion sources of particles. I. Health relevance and source signatures. *Chemosphere*. **49**, 1045–1058 (2002).

Moss, OR. Simulants of lung interstitial fluid. *Health Phys*. **36**, 447–448 (1979).

Mugica-Álvarez, V. *et al.* Concentrations and properties of airborne particles in the Mexico City subway system. *Atmos. Environ*. **49**, 284–293 (2011).

Mukhtar, A and Limbeck, A. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: a review. *Anal. Chim. Acta*. **774**, 11–25 (2013).

Mustafa, K. *et al.* Trace Metal Solid State Speciation in Aerosols of the Northern Levantine Basin, East Mediterranean. *J. Atmos. Chem*. **56**, 239–257 (2007).

Negrini, S. *et al.* Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11(3)**, 220-8 (2010).

Nemmar, A. *et al.* Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. **105**, 411–414 (2002a).

Nemmar, A. *et al.* Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1665–1668 (2001).

Nichol, J. Smoke haze in Southeast Asia: a predictable recurrence. *Atmos. Environ.* **32**, 2715–2716 (1998).

Niu, J. *et al.* Concentration distribution and bioaccessibility of trace elements in nano and fine urban airborne particulate matter: influence of particle size. *Water Air Soil Pollution.* **213**, 211–235 (2010).

Nocker, RE. *et al.* Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* **109**(2), 183–91 (1996).

Norlin, A. *et al.* Investigation of interfacial capacitance of Pt, Ti and TiN coated electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. *Biomol Eng.* **19**, 67 (2002).

Norris, G. *et al.* An association between fine particles and asthma emergency department visits for children in Seattle. *Environ Health Perspect.* **107**, 489–493 (1999).

Nriagu, JO. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature.* **338**, 47 (1989).

Ntziachristos, L. *et al.* Relationship between redox activity and chemical speciation of size-fractionated particulate matter. *Part Fibre Toxicol.* **7**, 4:5 (2007).

Ny, MT and Lee, BK. Size distribution of airborne particulate matter and associated metallic elements in an urban area of an industrial city in Korea. *Aerosol Air Qual. Res.* **11**, 643–653 (2011).

Oberdorster, G. *et al.* Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **65**, 1531–1543 (2002).

Oh, S.M. *et al.* Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat. Res.* **723**(2), 142–151 (2011).

Okazaki, Y and Gotoh, E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials.* **26**, 11, (2005).

Oller, AR. *et al.* Comparison of nickel release in solutions used for the identification of water-soluble nickel exposures and in synthetic lung fluids. *Journal of Environmental Monitoring.* **11**, 823–829 (2009).

Oomen, AG. *et al.* How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis. RIVM report 711701042: 108 p (2006).

Ostertag EM. *et al.* SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1444–1451 (2003).

Ostertag, EM and Kazazian, HH Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet.* **35**, 501–538 (2001).

Ostro, B. *et al.* Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: Results from CALFINE. *Environ. Health Perspect.* **114**(1), 29–33 (2006).

Ostro, B. *et al.* The effects of components of fine particulate air pollution on mortality in California: results from CALFINE. *Environ Health Perspect.* **115**, 13–19 (2007).

Ovrevik, J. *et al.* AHR and Arnt differentially regulate NF-kappaB signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells. *Cell Commun. Signal.* **12**, 48 (2014).

Paez, JG. *et al.* Science. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. **304**(5676), 1497–500 (2004).

Pakkanen, TA. *et al.* Use of atmospheric elemental size distributions in estimating aerosol sources in the Helsinki area. *Atmos. Environ.* **35**, 5537–5551 (2001).

Pankow, JF. An absorption model of gas/particle partitioning of organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric Environment.* **28**, 185–188 (1994).

Pearce, N. *et al.* Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J.* **12**, 315–35 (1998).

Pearson, JF. *et al.* Association between fine particulate matter and diabetes prevalence in the U.S. *Diabetes Care.* **33**(10), 2196–2201 (2010).

Pease, JE and Sabroe, I. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am. J. Respir. Med.* **1**, 19–25 (2002).

Pelucchi, C. *et al.* Long-term particulate matter exposure and mortality: a review of European epidemiological studies. *BMC Public Health.* **9**, 453 (2009).

Perotin, J. *et al.* Detection of multiple viral and bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a pilot prospective study. *J. Med. Virol.* **85**, 866–873 (2013).

Petters, MD and Kreidenweis, SM. A single parameter representation of hygroscopic growth and cloud condensation nucleus activity. *Atmos. Chem. Phys.* **7**, 1961–1971 (2007).

Pezzulo, AA. *et al.* The air–liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **300**, 25–31 (2011).

Phalen, RF and Oldham, MJ. An Airway Model for the Laboratory Mouse. NiPERA, Nov (1991).

Phalen, RF. *et al.* Application of an idealized model to morphometry of the mammalian tracheobronchial tree. *Anat Rec.* **190**, 167–176 (1978).

Philip, S. *et al.* Global Chemical Composition of Ambient Fine Particulate Matter for Exposure Assessment. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 13060–13068 (2014).

Picquout, A. *et al.* Air traffic disturbance due to the 2010 Merapi volcano eruption. *J. Volcanol. Geoth. Res.* **261**, 366–375 (2013).

Pines, J and Rieder, CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol.* **3**(1), E3–6 (2001).

Pope 3rd, CA. Particulate air pollution and lung function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 485e486 (2014).

Pope III, C. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *Journal of American Medical Association*. **287**(9), 1132-1141 (2002).

Pope, CA. *et al.* Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. **109**, 71-7 (2004).

Pope, CA. *et al.* Lung cancer and cardiovascular disease mortality associated with ambient air pollution and cigarette smoke: shape of the exposure-response relationships. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1616-1621 (2011).

Pope, CA. *et al.* Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal Toxicol.* **7**, 1-18 (1995).

Prieditis, H and Adamson, IYR. Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp. Lung Res.* **28**(7), 563-576 (2002).

Pritchard, RJ. *et al.* Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal Toxicol.* **8**, 457-478 (1996).

Pulido, MD and Parrish, AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* **533**, 227-241 (2003).

Pulles, T. *et al.* Emission factors for heavy metals from diesel and petrol used in European vehicles. *Atmospheric Environment*. **61**, 641-651 (2012).

Putaud, JP. *et al.* A European aerosol phenomenology—2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment*. **38**, 2579-2595 (2004).

Putaud, JP. *et al.* European aerosol phenomenology—3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban and kerbside sites across Europe. *Atmos. Environ.* **44**, 1308-1320 (2010).

Qiu, J. Epigenetics: unfinished symphony. *Nature*. **11**, 143-5 (2006)

Querol, X. *et al.* Variability in regional background aerosols within the Mediterranean. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **9**, 4575-4591 (2009).

Raaschou-Nielsen, O. *et al.* 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**(9), 813-22 (2013).

Raaschou-Nielsen, O. *et al.* Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environment International*. **87**, 66-73 (2016).

Rasmussen, PE. Elements and their compounds in indoor environments. In E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, & M. Stoepler (Eds.), *Elements and their compounds in the environment* (2nd ed.), vol. 1, chap. 11 (pp. 215-234). Weinheim: Wiley (2004).

Rauch, TA. *et al.* High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**, 252-7 (2008).

Raviv, S. *et al.* Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Critic Care Med.* **183**(9), 1138-1146 (2011).

Reeder, RJ and Schoonen, MAA. Metal Speciation and Its Role in Bioaccessibility and Bioavailability. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*. **64**, 55p (2006).

Regamey, N. *et al.* Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax*. **66**, 624-629 (2011).

Rimetz-Planchon, J. Les aérosols de pollution en zone urbaine et industrielle sous influence marine, Physico-chimie des particules. Thèse, Université des Sciences et Technologies de Lille, 284 p (2008).

Riva, DR. *et al.* Low dose of fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhal. Toxicol.* **23**(5), 257-267 (2011).

Robertson, KD and Wolffe, AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet.* **1**, 11-9 (2000).

Rode, L. *et al.* Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46 396 individuals. *Thorax*. **68**, 429-435 (2013).

Rodosthenous, RS. *et al.* Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. *Part Fibre Toxicol.* **8**, 13:13 (2016).

Roos, F. *et al.* Fibres d'aramide : élément pour l'évaluation des risques. INRS, Document pour le Médecin du Travail N° 95 : 12 p (2003).

Ross, AJ. *et al.* Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **37**, 169-185 (2007).

Rossmann, T.G. Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutat. Res.* **533**, 37-65 (2003).

Rothen-Rutishauser, BM. *et al.* In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1075-1089 (2008).

Ruby, MV. *et al.* Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*. **33**, 3697-3705 (1999).

Ruby, MV. *et al.* Estimation of lead and 659 arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science & Technology*. **30**, 422-430 (1996).

Ruckert, R *et al.* Air pollution and inflammation (interleukin-6, C-reactive protein, fibrinogen) in myocardial infarction survivors. *Environ Health Perspect.* **115**, 1072-80 (2007).

Rumelhard, *et al.* Expression and role of EGFR ligands induced in airway cells by PM<sub>2.5</sub> and its components. *Eur Respir J.* **30**, 1064-1073 (2007).

Rumelhard, M. *et al.* Effects of PM<sub>2.5</sub> components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells. *Toxicol. Lett.* **168**(2), 155-164 (2007).

Saint-Georges, F. *et al.* Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>). *Toxicology*. **244**, 220-230 (2008).

Saint-Georges, F. *et al.* Role of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in the occurrence of loss of heterozygosity in multiple critical regions of 3p chromosome in human epithelial lung cells (L132). *Toxicol Lett.* **187**, 172-179 (2009).

Saldiva, PH. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 721-728 (2008).

Samet, JM. *et al.* Particulate air pollution and mortality: findings from 20 U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1742–1757 (2000).

Samuels, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* **304**, 554 (2004).

Sancini, G. *et al.* Health Risk Assessment for Air Pollutants: Alterations in Lung and Cardiac Gene Expression in Mice Exposed to Milano Winter Fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>). *PLoS One.* **9(10)**, e109685 (2014).

Santé publique France. Impacts sanitaires de la pollution de l'air en France: nouvelles données et perspectives. (2016).

Sato, H. *et al.* Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis.* **21**, 653–61 (2000).

Schauer, JJ. *et al.* Characterization of Metals Emitted from Motor Vehicles. *Health Effects Institute - Synopsis of Research Report.* **133**, 98p (2006).

Schins, RP and Knaapen, AM. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhalation Toxicology.* **19**, 189-198 (2007).

Schins, RP. *et al.* Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol.* **195(1)**, 1-11 (2004).

Schleicher, NJ. *et al.* Temporal variability of trace metal mobility of urban particulate matter from Beijing e A contribution to health impact assessments of aerosols. *Atmospheric Environment.* **45**, 7248-7265 (2011).

Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* **110**, 669–672 (2002).

Schneidmesser, EV. *Et al.* Toxic metals in the atmosphere in Lahore, Pakistan. *Science of the Total Environment.* **408**, 1640–1648 (2010).

Schnekenburger, M. *et al.* HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1769**, 569–578 (2007)

Schraufstatter, I. *et al.* Oxidant- induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest.* **82**, 1040–50 (1988).

Schrenk, HH. *et al.* Air pollution in Donora, Pa.: epidemiology of the unusual smog episode of October 1948. Public Health Service: Washington, D.C. (1949).

Schroeder, WHM. *et al.* Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: A review. *J Air Pollut Control Assoc.* **37**, 1267-1285 (1987).

Schwartz, J and Neas, LM. Fine particles are more strongly associated than coarse particles with acute respiratory health effects in schoolchildren. *Epidemiology.* **11**, 6–10 (2000).

Schwartz, J. *et al.* Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc.* **46**, 927–939 (1996).

Schwartz, J. The effects of particulate air pollution on daily deaths: A multi-city case-crossover analysis. *Occup. Environ. Med.* **61**, 956–961 (2004).

Seinfeld, J and Pandis, S. Atmospheric Chemistry and Physics: from Air Pollution to Climate Change. The second edition. Wiley-Interscience, New York (2006).

Seinfeld, J and Pandis, S. Atmospheric Chemistry and Physics: from Air Pollution to Climate Change. Wiley-Interscience, New York (1998).

Semenza, GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* **148(3)**, 399-408 (2012).

Seoane, A.I. Dulout, F.N. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutat. Res.* **490**, 99–106 (2001).

Shaw, P. *et al.* Regulation of specific DNA binding by P53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene.* **12(4)**, 921-30 (1996).

Shaw, PH. The role of P53 in cell cycle regulation. *pathol Res Pract.* **192(7)**, 669-75 (1996).

Shen, J. *et al.* Plasma microRNAs as potential biomarkers for none small-cell lung cancer. *Lab Invest.* **91**, 579-87 (2011).

Sher, T. *et al.* Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc.* **83(3)**, 355–367 (2008).

Sherr, CJ and Roberts, JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13(12)**, 1501-12 (1999).

Shrey, K. *et al.* Air pollutants: the key stages in the pathway towards the development of cardiovascular disorders. *Environ Toxicol Pharmacol.* **31**, 1-9 (2011).

Simkhovich, BZ. *et al.* Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol.* **52**, 719 –726 (2008).

Sint, T. *et al.* Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol.* **20(1)**, 25-9 (2008).

Sorensen, M. *et al.* Personal exposure to PM<sub>2.5</sub> and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**, 191–196 (2003).

Soriano, JB. and Lamprecht, B. Chronic obstructive pulmonary disease: a worldwide problem. *Med. Clin. N. Am.* **96**, 671–680 (2012).

Spurgers, K. *et al.* Identification of cell cycle regulatory genes as principal targets of P53-mediated transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry.* **281**, 25134 - 25142 (2006).

Sternbeck, J. *et al.* Metal emissions from road traffic and the influence of resuspension—results from two tunnel studies. *Atmos Environ.* **36**, 4735–44 (2002).

Stone, EA. *et al.* Composition of Fine and Coarse Particulate Matter in Gosan, Korea during the Springtime Dust Season. *Aerosol Air Qual. Res.* **11**, 31–43 (2011).

Stopford, W. *et al.* Bioaccessibility testing of cobalt compounds. *J Environ Monit.* **5**, 675–680 (2003).

Stortini, AM. *et al.* An evaluation of the PM<sub>2.5</sub> trace elemental composition in the Venice Lagoon area and an analysis of the possible sources. *Atmospheric Environment.* **43(40)**, 6296–6304 (2009).

Strahl, BD and Allis, CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* **403**, 41–45 (2000).

Sunyer, J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Eur. Respir.* **17**, 1024–1033 (2001).

Suresh, K. *et al.* Particle deposition in human respiratory system: Deposition of concentrated hygroscopic aerosols. Inhalation. *Toxicology.* **21(7)**, 619–630 (2009).

Suryadinata, R. *et al.* Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep.* **30(4)**, 243–55 (2010).

Suwa, T. *et al.* Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 935–942 (2002).

Taiwo, A.M. *et al.* Receptor modelling of airborne particulate matter in the vicinity of a major steelworks site. *Sci. Total Environ.* **490**, 488–500 (2014).

Takaya, M. *et al.* Dissolution of functional materials and rare earth oxides into pseudo alveolar fluid. *Ind Health.* **44**, 639–44 (2006).

Tang, IN and Munkelwitz, HR. Aerosol phase transformation and growth in the atmosphere. *Journal of Applied Meteorology.* **33**, 791–796 (1994).

Tao, F and Kobzik, L. Lung macrophage-epithelial cell interactions amplify particle-mediated cytokine release. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **26(4)**, 499–505 (2002).

Taunton, AE. *et al.* Geochemistry in the lung: reaction-path modelling and experimental examination of rock forming minerals under physiologic conditions. *Am Mineral.* **95**, 1624–35 (2010).

Thiesse, J. *et al.* Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging. *J Appl Physiol (1985).* **109(6)**, 1960–8 (2010).

Tian, Y. *et al.* Ah receptor and NF-κB interplay on the stage of epigenome. *Biochem Pharmacol.* **77**, 670–680 (2009).

Timblin, C.R. *et al.* Ultrafine airborne particles cause increases in proto-oncogene expression and proliferation in alveolar epithelia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **179**, 100–104 (2002).

Timothy, V. *et al.* The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* **18(3)**, 207–250 (2008).

To, T. *et al.* Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health.* **12**, 204 (2012).

Topinka, J. *et al.* Biomarkers of air pollution exposure a study of policemen in Prague. *Mutat Res.* **624**, 9e17 (2007).

Traversi, D. *et al.* Mutagenic properties of PM<sub>2.5</sub> urban pollution in the northern Italy: the nitro-compounds contribution. *Environ. Int.* **35(6)**, 905–910 (2009).

Turin, TC. *et al.* Short-term exposure to air pollution and incidence of stroke and acute myocardial infarction in a Japanese population. *Neuroepidemiology.* **38**, 84–92 (2012).

Turner, J and Jones, CE. Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 877–881 (2009).

Turner, MC. *et al.* 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 (2011).

Turpin, BJ. *et al.* Measuring and simulating particulate organics in the atmosphere: problems and prospects. *Atmospheric Environment.* **34**, 2983–3013 (2000).

Ulrich, MMW. *et al.* Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J. Toxicol. Environ. Health.* **65**, 1571–1595 (2002).

Upadhyay, D. *et al.* Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **29**, 180–187 (2003).

USEPA: Air quality criteria for particulate matter (Final Report, Oct 2004). U.S. Environmental Protection Agency Washington DC, EPA 600/P-99/002aF-bF; (2004).

Utell, MJ and Frampton, MW. Toxicologic methods: Controlled human exposures. *Environ. Health Persp.* **108**, 605–613 (2000).

Utsunomiya, S. *et al.* Direct identification of trace metals in fine and ultrafine particles in the Detroit urban atmosphere. *Environ Sci Technol.* **38(8)**, 2289–97 (2004).

Uzu, G. *et al.* Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution.* **157**, 1178–1185 (2009).

Uzu, G., *et al.* Characterization of lead- recycling facility emissions at various workplaces: Major insights for sanitary risks assessment. *Journal of Hazardous Materials, HAZMAT* **12467**, 1–10 (2010).

Vaattovaara, P. *et al.* The composition of nucleation and Aitken mode particles during coastal nucleation events: evidence for marine secondary organic contribution. *Atmospheric Chemistry and Physics.* **6**, 4601–4616 (2006).

Valentine, R and Kennedy, GL. Inhalation toxicology. Hayes Principles and methods of toxicology, 5th edn. CRC Press, New York. Oct (2014).

Van Den Broeck, A. *et al.* Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **14**, 7237–45 (2008).

Van Golde, LMG. *et al.* The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol Rev.* **68**, 374–455 (1988).

Van Meerbeeck, JP. *et al.* Small-cell lung cancer. *Lancet.* **378**, 1741–1755 (2011).

Vander Heiden, MG. *et al.* Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. **324**, 1029-33 (2009).

Varghese, SK and Gangamma, S. Particle deposition in human respiratory system: deposition of concentrated hygroscopic aerosols. *Inhal Toxicol*. **2**, 619–630 (2009).

Vecchi, R. *et al.* Organic and inorganic sampling artefacts assessment. *Atmospheric Environment*. **43**, 1713–1720 (2009).

Vecchi, R. *et al.* The role of atmospheric dispersion in the seasonal variation of PM<sub>1</sub> and PM<sub>2.5</sub> concentration and composition in the urban area of Milan (Italy). *Atmospheric Environment*. **38**, 4437–4446 (2004).

Veldhuizen, EJ *et al.* The carbohydrate recognition domain of collectins. *FEBS J*. **278**(20), 3930-41 (2011).

Viau, C. *et al.* Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi. *Int Arch Occup Environ Health*. **73**, 331–338 (2000).

Vidal, A and Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*. **247**(1-2), 1-15 (2000).

Volckens, J. *et al.* Direct particle-to-cell deposition of coarse ambient particulate matter increases the production of inflammatory mediators from cultured human airway epithelial cells. *Environ Sci Technol*. **43**(12), 4595–4599 (2009).

Vyas, S. *et al.* Mitochondria and cancer. *Cell*. **166**(3), 555-566 (2016).

Wagner, G. Ending the prolonged life of cancer cells. *Nat Chem Biol*. **1**(1), 8-9 (2005).

Wählin, P. *et al.* Characterization of traffic-generated particulate matter in Copenhagen. *Atmos. Environ*. **40**, 2151–2159 (2006).

Wallenborn, G. *et al.* Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. *Toxicol. Sci*. **98**(1), 231–239 (2007).

Wang, G. *et al.* Characterization of water-soluble species of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> aerosols in urban area in Nanjing, China. *Atmospheric Environment*. **36**, 1299–1307 (2002).

Wang, G. *et al.* Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM) exposures. *Environ. Toxicol*. **30**(3), 343-56 (2013).

Wang, T. *et al.* Epigenetic regulation in particulate matter-mediated cardiopulmonary toxicities: a systems biology perspective. *Curr Pharmacogenomics Person Med*. **10**(4), 314–321 (2012).

Wang, YF. *et al.* Emissions of fuel metals content from a diesel vehicle engine. *Atmospheric Environment*. **37**, 4637–4643 (2003).

Watanabe, K. *et al.* Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. **130**, 2580-90 (2012).

WHO. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. (2007). [www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf](http://www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf).

WHO. Health relevance of particulate matter from various sources. Report on a WHO workshop Bonn, Germany 26 –27 March 2007. [http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0007/78658/E90672.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0007/78658/E90672.pdf) [accessed June 2010].

WHO. Health risks of heavy metals from long range transboundary air pollution (2007).

WHO. Million Premature Deaths Annually Linked to Air Pollution. Available at: p.7. viewed May 30, 2016. [www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/).

Wieprecht, W. *et al.* INTERCOMP2000: ionic constitution and comparison of filter and impactor. *Atmospheric Environment*. **38**, 6477-6486 (2004).

Willerson, JT and Ridker, PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. **109**, II2–10 (2004).

Williams, MA. *et al.* Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J Immunol*. **181**, 4545–59 (2008).

Winkler-Heil, R and Hofmann, W. Modeling particle deposition in the Balb/c mouse respiratory tract. *Inhal Toxicol*. **28**(4), 180-91 (2016).

Wiseman, CL and Zereini, F. Characterizing metal (loid) solubility in airborne PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1</sub> in Frankfurt, Germany using simulated lung fluids. *Atmos. Environ*. **89**, 282–289 (2014).

Wiseman, CLS. *et al.* Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. *Anal. Chim. Acta*. **877**, 9-18 (2015).

Wistuba, II. *et al.* Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin Cancer Res*. **5**(5), 991-1000 (1999).

WMO/IGAC. Impacts of Megacities on Air Pollution and Climate [online], <http://www.wmo.int/pages/prog/arep/gaw/gaw-reports.html> (2012).

Wong, JY. *et al.* Cumulative PM<sub>2.5</sub> exposure and telomere length in workers exposed to welding fumes. *J Toxicol Environ Health A*. **77**(8), 441-55 (2014).

Wright, RO and Schwartz, J. Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons. *Environ health perspect*. **118**, 790-52 (2010).

Wu, YS. *et al.* A review of atmospheric fine particulate matter and its associated trace metal pollutants in Asian countries during the period 1995–2005. *J. Hazard. Mater*. **143**, 511–515 (2007).

Xi, G. *et al.* Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **302**(9), G1006-15 (2012).

Xia, T. *et al.* Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ. Health Perspect*. **112**, 1347–58 (2004).

Xie, Y. *et al.* Preexposure to PM<sub>2.5</sub> exacerbates acute viral myocarditis associated with Th17 cell. *Int. J. Cardiol*. **168**(4), 3837–3845 (2013).

Xiu, G. *et al.* Speciated mercury in size-fractionated particles in Shanghai ambient air. *Atmos. Environ*. **43**, 3145-3154 (2009).



Xu, D. *et al.* Study of ambient PM<sub>2.5</sub> on the influence of the inflammation injury and the immune function of subchronic exposure rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* **37** (4), 423–428 (2008).

Xu, X. *et al.* Inflammatory response to fine particulate air pollution exposure: neutrophil versus monocyte. *PLoS One.* **8**(8), e71414 (2013).

Yang, AS. *et al.* A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* **38**, 32–33 (2004).

Yang, IV and Schwartz, DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* **183**(10), 1295–301 (2011).

Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* **37**(Suppl. 4), S3–S8 (2001b).

Yi, S. *et al.* Water-insoluble fraction of oxidative stress in human lung epithelial A549 cells, *Environ. Toxicol.* **29**, 226–233 (2014).

Ying, Z. *et al.* Long-term exposure to concentrated ambient PM<sub>2.5</sub> increases mouse blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation. *Environ. Health Perspect.* **122**(1), 79–86 (2014).

Young, R.P. *et al.* Gamble, COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history, *Eur. Respir. J.* **34** 380–386 (2009).

Yu, L and Yao, H. Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases. *Br J. Pharmacol.* **173**, 2305–2318 (2016).

Yuan, JM. *et al.* Urinary metabolites of a polycyclic aromatic hydrocarbon and volatile organic compounds in relation to lung cancer development in lifelong never smokers in the Shanghai Cohort Study. *Carcinogenesis.* **35**, 339–345 (2014).

Yun, YP. *et al.* Diesel exhaust particles induce apoptosis via P53 and MDM2 in J774A.1 macrophage cell line. *Toxicol In Vitro.* **23**, 21–8 (2009).

Zaiss, DM. *et al.* Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation and tissue repair. *Immunity.* **42**(2), 216–226 (2015).

Zanobetti, A and Schwartz, J. Air pollution and emergency admissions in Boston. *J Epidemiol Community Health.* **60**, 890–5 (2006).

Zereini, F. *et al.* Concentration and distribution of heavy metals in urban airborne particulate matter in Frankfurt am Main, Germany. *environmental science & technology.* **39**, 2983–2989 (2005).

Zhang, J. *et al.* Ambient particulate matter induces alveolar epithelial cell cycle arrest: role of G1 cyclins. *FEBS Lett.* **581**, 5315–5320 (2007).

Zhang, Y. *et al.* Aerosol pollution in some Chinese cities. *Pure and Applied Chemistry.* **76**, 1227–1239 (2004).

Zhang, Z. *et al.* Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages. *Environ Res.* **82**, 245–52 (2000).

Zhao, H. *et al.* Exposure to particulate matter increases susceptibility to respiratory *Staphylococcus aureus* infection in rats via reducing pulmonary natural killer cells. *Toxicology.* **325**, 180–188 (2014).

Zhao, J. *et al.* The biological effects of individual-level PM<sub>2.5</sub> exposure on systemic immunity and inflammatory response in traffic policemen. *Occup. Environ. Med.* **70**(6), 426–31 (2013).

Zhao, X. *et al.* Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutat Res.* **514**(1–2), 177–192 (2002).

Zhou, B. *et al.* P53-Dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE) cells by PM(2.5) sampled from air in Guangzhou, China. *Toxicol Mech Methods.* **24**(8), 552–9 (2014).

Zhou, X. *et al.* Effects of nickel, chromate, and arsenite on histone 3 lysine methylation. *Toxicol Appl Pharmacol.* **236**(1), 78–84 (2009).

Zöchbauer-Müller, S. *et al.* Aberrant promoter methylation of multiple genes in non- small cell lung cancers. *Cancer Res.* **61**, 249–55 (2001).

Zufall, MJ and Davidson, CI. Dry deposition of particles. *Atmospheric particles.* **5**, 425–473 (1998).

## Résumé

Les particules atmosphériques sont responsables de 3,2 millions de morts par an, cette mortalité faisant suite à des cardiopathies, bronchopathies ou encore des cancers. De nombreuses études épidémiologiques et mécanistiques associent l'augmentation de la prévalence des cancers pulmonaires avec l'exposition à la pollution atmosphérique et aux particules fines (PM<sub>2,5</sub>), d'où leur classification très récente comme cancérigène avéré pour l'homme par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC groupe 1). Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogénicité pulmonaire des polluants atmosphériques restent encore très controversés, ceci étant notamment lié à l'utilisation de modèles de culture cellulaire très éloignés des conditions *in vivo*. De plus, les PM<sub>2,5</sub> présentent une complexité physico-chimique (taille, nombre, morphologie et composition chimique) et une grande variabilité temporelle. En effet, ces particules sont constituées de nombreux polluants toxiques organiques, notamment des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), ou encore des métaux, et ce à des teneurs parfois importantes. La complexité de leur composition rend les données toxicologiques difficilement interprétables, d'autant plus que la majorité des études toxicologiques publiées jusqu'à récemment ont souvent négligé la détermination de leur caractéristiques physicochimiques.

Mon projet de thèse a pour objectif d'évaluer le rôle des PM<sub>2,5</sub>, prélevées sur un site urbain (Lille), dans la cancérogenèse pulmonaire et ce, par une approche pluridisciplinaire qui permettra d'établir un lien étroit entre la physicochimie et la toxicologie de ces particules.

La première partie de mon projet est consacrée aux prélèvements des PM<sub>2,5</sub>, à Lille, au cours de deux saisons contrastées, et à l'évaluation de leurs principales caractéristiques physico-chimiques, à savoir leur granulométrie, leur composition chimique (métaux et HAP) ou encore leur bioaccessibilité dans des milieux de culture cellulaire ou des fluides bronchiques.

La seconde partie consiste au développement d'un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines, issues de sujets sains et de patients atteints de Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstrucives (BPCO), différenciées à l'interface air/liquide, puis exposées de manière répétée à des concentrations relativement faibles des PM<sub>2,5</sub> prélevées à Lille. Ce modèle innovant permet de mieux intégrer un certain nombre de facteurs liés à la préexistence d'un état inflammatoire chronique et d'obtenir un état de différenciation cellulaire le plus proche possible des conditions d'exposition *in vivo*. Sur ce modèle cellulaire, après exposition, le phénotype inflammatoire, l'état de stress oxydatif ainsi que les modifications génétiques et épigénétiques sont étudiés.

Les résultats de ce travail contribueront par une approche pluridisciplinaire à mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à la toxicité voire la cancérogénicité des PM<sub>2,5</sub>, et à expliquer pourquoi les individus atteints de BPCO sont plus sensibles que les sujets sains à l'exposition à long terme à des niveaux usuels de PM<sub>2,5</sub>.

## Abstract

Atmospheric particles are responsible for 3.2 million deaths per year, this mortality is due to heart diseases, bronchial diseases or cancers. Numerous epidemiological and toxicological studies associate the lung cancer prevalence increase with exposure to air pollution and particularly fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>). PM<sub>2.5</sub> were recently classified as carcinogen to humans by International Agency for Research in Cancer (IARC group 1). Cellular and molecular mechanisms involved in air pollutants pulmonary pathogenicity are still very controversial. This is particularly related to the use of cell culture models far from *in vivo* conditions. In addition, PM<sub>2.5</sub> have a physico-chemical complexity (size, number, morphology and chemical composition) and a high temporal variability. Indeed, these particles contain many toxic organic pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), or metals, and sometimes at significant levels. The complexity of their composition makes the toxicological data difficult to interpret, especially as the majority of toxicological studies published until recently have often overlooked the determination of their physicochemical characteristics.

My thesis project aims at assessing the role of PM<sub>2.5</sub>, sampled on an urban site (Lille), in lung carcinogenesis through a multidisciplinary approach which will establish a tight connection between chemistry and toxicology of these particles.

The first part of my project consisted of the PM<sub>2.5</sub> sampling, in Lille, during two contrasting seasons, and the evaluation of their main physical and chemical characteristics, as their size, chemical composition (metals and PAHs) or their bioavailability in cell culture media or bronchial fluids.

The second part consisted of the development of human bronchial epithelial cells from healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), differentiated in air / liquid interface conditions, and exposed to repeated low concentrations of PM<sub>2.5</sub> collected in Lille. This innovative model better integrates a number of factors related to the pre-existence of a chronic inflammatory state and gets the closest cell differentiation state possible to the *in vivo* exposure conditions. On this cellular model, after exposure, the inflammatory phenotype, the oxidative state as well as genetic and epigenetic status were studied.

Using a multidisciplinary approach, the results of this work will contribute to better understand the molecular mechanisms related to PM<sub>2.5</sub> toxicity or carcinogenicity, and to explain why COPD patients are more sensitive than healthy people to PM<sub>2.5</sub> long term exposure.