

Caractérisation physico-chimique et évaluation toxicologique de fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre et de fumigènes : étude comparative Malik Mekki

► To cite this version:

Malik Mekki. Caractérisation physico-chimique et évaluation toxicologique de fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre et de fumigènes : étude comparative. Sciences agricoles. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR140 . tel-01794023

HAL Id: tel-01794023 https://theses.hal.science/tel-01794023

Submitted on 17 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Caractérisation physico-chimique et évaluation toxicologique de fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre et de fumigènes : étude comparative.

Présentée et soutenue par Malik MEKKI

Th	èse soutenue publiquement le 9 Juin 20 devant le jury composé de	17
M Laurent VERNHET	Professeur des Universités Université de Rennes	Rapporteur
M Dominique COURCOT	Professeur des Universités Université du Littoral Côte d'Opale	Rapporteur
Mme Caroline MAISONNEUVE	Docteur en Toxicologie Direction Générale de l'Armement - Paris	Examinateur
Mme Sophie ACHARD	Maître de Conférences Université de Pharmacie de Paris	Examinateur
Mme Christelle MONTEIL	Professeur des Universités Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme Véronique ANDRE	Maître de Conférences Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse co-encadrée par le Dr. Cécile Corbière, Université de Rouen Normandie, EA4651







Remerciements

La thèse de doctorat représente un travail s'inscrivant dans la durée, et pour cette raison, constitue le fil conducteur d'une partie de ma vie. C'est pourquoi je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont permis, de près ou de loin, la réalisation ce projet professionnel et personnel par l'apport de leur savoir ainsi que de leur soutien.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Christelle MONTEIL, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe ABTE/ToxEMAC depuis ma deuxième année de Master et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés.

Je remercie tout aussi chaleureusement le Dr. Cécile CORBIERE, ma co-encadrante de thèse, qui m'a accompagné tout au long de ce travail, m'initiant au vaste monde de la culture cellulaire, avec gentillesse, rigueur scientifique et confiance.

Je remercie ma co-directrice de thèse, le Dr. Véronique ANDRE, qui a su se rendre indispensable malgré la distance tout au long de ce projet, par ses conseils avisés, par l'apport de ses connaissances scientifiques dans le domaine de la génotoxicité ainsi que par ses relectures du manuscrit de thèse.

Je remercie également le Pr. Laurent VERNHET et le Pr. Dominique COURCOT de me faire l'honneur de rapporter ce travail et d'y apporter leur expertise scientifique. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond respect.

Je remercie également le Dr. Caroline MAISONNEUVE et le Dr. Sophie ACHARD d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Votre présence est un honneur.

Je remercie M. Jean-Ulrich MULLOT, pour m'avoir si bien accueilli au sein de la base navale de Toulon lors de mes deux séjours, pour son accompagnement plus que nécessaire lors des prélèvements sur stand de tir et pour la transmission de ses connaissances dans le domaine balistique et militaire.

Je remercie pour son aide financière la Direction Générale de l'Armement ainsi que les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie le Centre Commun de Mesure et plus particulièrement le Dr. Dorothée DEWAELE et le Dr. Fabrice CAZIER, pour leur collaboration, l'apport de leur connaissance concernant la caractérisation physico-chimique des particules ainsi que leur bonne humeur et leur amitié lors des différentes campagnes de prélèvement. Je remercie la société VITROCELL, avec une attention particulière à M. Tobias KREBS, pour leur confiance et le prêt du prototype de nébuliseur, permettant la finalisation de cette étude.

Je remercie le laboratoire COBRA et plus particulièrement le responsable M. Stéphane MARCOTTE, pour les analyses supplémentaires de la caractérisation des métaux des particules de tir.

Je remercie Gaetan RIOU (Université de Rouen/Inserm, IRIB, plateforme de cytométrie en flux) pour sa contribution en analyse de cytométrie en flux.

Je souhaite remercier l'ensemble du laboratoire EA4651 ABTE/ToxEMAC :

Claire, qui reprend les rênes de ce projet passionnant et qui a amplement contribué à l'élaboration de cette thèse par son Master. J'espère te laisser des bases solides afin que tu puisses apporter de nouvelles pierres à cet édifice. Bon courage pour la suite.

Ahmed, pour la camaraderie, l'écoute et le soutien dont tu as fait preuve tout au long de ces années et qui n'étaient pas du tout acquis à notre rencontre. Je te laisse en tant que grand manitou du bureau des étudiants, pour accompagner et guider les futurs étudiants qu'il accueillera.

Cathy pour ton savoir-faire, ta grande disponibilité et ton implication dans mes protocoles et dans la vie du laboratoire. Tu es un rouage indispensable au bon fonctionnement de cette machine qu'est le laboratoire. Merci beaucoup.

Jean-Marie, pour son soutien et ses petites histoires et anecdotes sur le café distillé lors de ses passages au bureau.

Karine, pour ta gentillesse, ton aide lors des TP et ton sourire du quotidien.

A Clément, mon ancien compagnon de paillasse avec qui j'ai partagé grand nombre de fou rire au laboratoire comme en dehors. Cette relation professionnelle s'est transformée en véritable amitié, malgré la distance qui nous sépare aujourd'hui. Et oui tu es Parisien maintenant. En espérant que cette belle amitié dure très longtemps. A bientôt mon ami.

A Najah et Alexandre, anciens collègues lors de mon passage dans l'unité U1096 et maintenant amis. Merci de votre soutien, de vos rires, de ton écoute Najah et de ton excentricité Alexandre. Un peu comme Tom et Jerry, vous vous chamaillez mais l'un va avec l'autre.

A mes amis, Marie-Ange, Anne Sophie, Stéphane, Parastoo, Mathieu, Cédric et Aurélie, pour votre soutien, pour les soirées, les moments de joie, de délire comme de tristesse. Merci d'être présent et d'exister.

A ma mère, qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours soutenu dans ma vie et mes choix qu'ils soient bons ou mauvais. Je te dois tout ce que je suis devenu aujourd'hui et ces remerciements sont une autre occasion de te dire merci et de te dire que je t'aime.

A ma sœur, Marine, pour qui je suis le meilleur des grand-frères (bon ok je suis le seul) et pour qui je m'efforce de donner le meilleur de moi-même pour qu'elle soit fière de son grand-frère.

A Céline, ma chérie, toi qui supportes mes longues soirées de travail devant mon ordinateur, toi qui me soutiens au quotidien depuis plus de 6 ans (car oui apparemment j'aurais un sale caractère). Je voudrais te remercier pour tes rires et tes pleures qui rythment ma vie, ton soutien, ta confiance et ton sourire qui me donnent le courage d'avancer. J'espère continuer d'avancer à tes cotés encore beaucoup d'années afin que l'on puisse construire notre monde à nous.

Table des matières

Table d	es illustrations	7
Figure	es	7
Table	aux	10
Anne	xes	11
Liste de	s abréviations	13
Résume	غ	16
Abstrac	t	17
Introduc	ction	18
I- F	Pollution atmosphérique	19
1-	Définition	19
2-	Composition de l'atmosphère	20
3-	Pollution locale, régionale et globale	21
4-	Sources de pollution	24
5-	Polluants atmosphériques	27
6-	Évaluation de la pollution atmosphérique	34
II- F	Pollution particulaire	36
1-	Définition	36
2-	Cycle de vie de la matière particulaire	36
3-	Taille des particules atmosphériques	39
4-	Composition chimique des particules	41
5-	Méthodes de mesure de la pollution particulaire	44
111-	Impact sanitaire de la pollution particulaire	46
1-	L'appareil respiratoire : voie d'accès principale	46
2-	Effets sanitaires induits par les particules	52
3-	Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité des particules	57
IV-	Activité pyrotechnique et particules	70
1-	Feux d'artifice	70
2-	Particules de tir	71
3-	Fumigènes	73

4-	Réglementation et protection professionnelle	. 78
Objec	ctifs de l'étude :	. 81
Matérie	l et Méthodes	. 82
I- F	Prélèvements	. 84
1-	Présentation des campagnes de prélèvement	. 84
2-	Collecte des particules par impaction	. 84
3-	Synthèse des campagnes de prélèvements	. 87
II- C	Caractérisation physico-chimique des particules issues d'activités pyrotechniques	. 88
1-	Détermination de la granulométrie	. 88
2-	Détermination de la fraction inorganique des particules	. 89
3-	Détermination de la fraction organique des particules	. 93
4-	Synthèse des analyses physico-chimiques réalisées	. 95
-	Étude toxicologique des particules issues d'activités pyrotechniques	. 96
1-	Culture cellulaire	. 96
2-	Évaluation de la toxicité in vitro	. 96
3-	Évaluation des effets mutagènes	102
4-	Évaluation de quelques marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation	104
5-	Expositions à l'interface « pseudo air-liquide » (ALI)	110
6-	Analyse statistique	112
Résulta	ts et Discussion	113
Étude 1 d'armes	: Caractérisation physico-chimique et analyse toxicologique des particules de tir à feu de petit calibre (9 mm).	115
I- C	Campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des particules de ti	r de
petit c	calibre.	116
1-	Granulométrie par mesure pondérale	116
2-	Analyse élémentaire	118
II- A	Analyse toxicologique des particules de tir de petit calibre après exposition en m	ode
imme	rgé	121
1-	Étude de la cytotoxicité de chlorure de cadmium (CdCl ₂)	121
2-	Etude de la cytotoxicité des particules de tir : influence du SVF	123
3-	Etude de la cytotoxicité des particules de tir : influence du mode d'exposition	130

-	Discussion de l'étude I
Étude 2 fumiaèn	: Caractérisation physico-chimique et analyse toxicologique des particules de es
I- C	campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des particules de
fumige	ènes141
1-	Granulométrie par analyseur de particules 141
2-	Granulométrie par mesure pondérale
3-	Analyse élémentaire
4-	Analyse des composés métalliques
5-	Analyse des composés organiques151
II- É	tude de la toxicité des particules de fumigènes154
1-	Évaluation de la mutagénicité154
2-	Évaluation de l'activité mitochondriale et des mécanismes d'exclusion
mer	nbranaire160
3-	Évaluation du cycle cellulaire
-	Étude de la cytotoxicité des particules de fumigène : influence du mode d'exposition
IV-	Étude des mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité particulaire165
1-	Évaluation du stress oxydant165
2-	Évaluation de l'inflammation170
V-	Discussion de l'étude II
Conclus	ion et perspectives
VALORI	SATION
ANNEX	ES
Bibliogra	aphie

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Évolution des concentrations en SO2, NO2, O3 et PM10 en France entre 2000 2015.) et .24
Figure 2 : Répartition par secteur des émissions de quelques polluants atmosphériques France (en %) de 1960 et 2003.	en .26
Figure 3 : Source et échelle de la pollution atmosphérique.	.27
Figure 4 : Classes d'aérosols selon leur mode de formation et leur taille.	. 37
Figure 5 : Principaux processus de formation des particules	. 38
Figure 6 : Distribution de taille de particules normalisée de l'aérosol typique de la chauss	ée.
	.41
Figure 7 : Structure hypothétique d'une particule d'aérosol	.43
Figure 8 : Mécanismes de dépôt des particules dans les voies respiratoires.	.49
Figure 9 : Dépôt respiratoire en fonction du diamètre particulaire	51
Figure 10 : Plan de dépôt planaire médian de trois nanoparticules différentes	51
Figure 11 : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduct	ion
monoélectronique de l'oxygène	58
Figure 12 : Hiérarchisation du modèle de stress oxydant en fonction du ratio GSH/GSSG	en
trois étapes	60
Figure 13 : Cross-talk entre les voies médiées par AhR et Nrf-2	61
Figure 14 : Structure classique d'une munition d'arme à feu	.72
Figure 15 : Vue globale et vue détaillée d'un impacteur en cascade et de ses 5 étages	.84
Figure 16 : Schéma du principe d'un étage d'impacteur	85
Figure 17 : Prélèvement des particules de tir de petit calibre (9 mm) sur le site de la ba	ase
navale de Toulon	.86
Figure 18 : Photographie du système de prélèvement utilisé lors des tirs de fumigènes	.86
Figure 19 : Photo des deux analyseurs de particules en temps réel.	.89
Figure 20 : Schéma simplifié de l'analyseur CHNS (GC-TCD)	92
Figure 21 : Schéma illustrant les différentes parties de la GC-MS.	.93
Figure 22 : Représentation schématique d'un extracteur soxhlet	.94
Figure 23 : Photographies représentant les différentes densités de particules de tir utilisé	es.
	.97
Figure 24 : Schémas du cycle cellulaire 1	00
Figure 25 : Exemple d'un profil du cycle cellulaire de cellules A549.	01
Figure 26 : Schéma représentant le profil de température utilisé lors de la PCR1	07
Figure 27 : Schéma explicatif de l'exposition de cellules à l'interface air-liquide 1	110

Figure 48 : Composés organiques majoritaires du fumigène 2 analysés par GC/MS	52
Figure 47 : Families de composes organiques majoritaires du fumigène 1 analysés par GC/MS	5. 51
l'échantillon	16
Figure 45 : Analyse élémentaire C, H, N, S des particules de fumigènes exprimée en % d	le
Figure 44 : Mesure pondérale moyenne des particules de fumigènes	4
cellules A549 (milieu de culture 1% SVF) en mode « pseudo-ALI »	31
Figure 43 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de tir (0 - 0,25 mg/mL) sur de	es
prolifération12	29
Figure 42 : Profil du cycle cellulaire d'une population de cellules A549 témoin après 24h d	le
A549 (milieu de culture à 10% et 1% de SVF)	28
Figure 41 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de tir (0 - 0,1 mg/mL) sur cellule	es
A549 (milieu de culture à 1% de SVF)12	27
Figure 40 : Cytotoxicité (Test Rouge Neutre) des particules de tir (0 - 0,5 mg/mL) sur cellule	es
(milieu de culture à 1% de SVF)	26
Figure 39 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de tir (0 - 0,50 mg/mL) sur cellules A54	19
(milieu de culture à 10% de SVF)12	26
Figure 38 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de tir (0 - 0,50 mg/mL) sur cellules A54	19
cellulaire des cellules A54912	25
Figure 37 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur les différentes phases du cyc	le
cellules A54912	24
Figure 36 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur la viabilité (Bleu Trypan) de	es
A54912	23
Figure 35 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur la viabilité (MTT) des cellule	es
A549 (milieu de culture à 10% de SVF)12	23
Figure 34 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) du chlorure de cadmium (0 - 75 µM) sur cellule	es
A549 (milieu de culture à 10% de SVF)12	22
Figure 33 : Cytotoxicité (Test Rouge Neutre) du chlorure de cadmium (0 - 125 µM) sur cellule	es
(milieu de culture à 10% de SVF)12	21
Figure 32 : Cytotoxicité (Test MTT) du chlorure de cadmium (0 - 125 µM) sur cellules A54	19
prélèvements de tir de petit calibre (9 mm) (2014 et 2015)	8
Figure 31 : Analyse élémentaire C,H,N,S des particules issues des deux campagnes d	le
fonction de leur diamètre aérodynamique11	7
Figure 30 : Masse des particules collectées sur pas de tir en Janvier 2014 et Mars 2015 e	en
Figure 29 : Schéma du système d'exposition VITROCELL® Cloud ALI 6 puits	1
Figure 28 : Photo du système d'exposition VITROCELL® Cloud ALI Starter Kit	1

Figure 50 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 1 vis-à-vis de cinq 5 souches de Salmonella Typhimurium Figure 51 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 2 vis-à-vis de cing souches de Salmonella Typhimurium (test Figure 52 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 3 vis-à-vis de cinq souches de Salmonella Typhimurium (test Figure 53 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 4 vis-à-vis de cinq souches de Salmonella Typhimurium (test Figure 54 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de fumigène 1 (0 - 0,35 mg/mL) sur cellules Figure 55 : Cytotoxicité (Test au Bleu Trypan) des particules de fumigène 1 (0 - 0,25 mg/mL) Figure 56 : Cytotoxicité (Test au MTT) des particules de fumigène 4 (0 - 0,5 mg/mL) sur cellules Figure 57 : Cytotoxicité (Test au Bleu Trypan) des particules de fumigène 4 (0 - 0,25 mg/mL) sur cellules A549......161 Figure 58 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de fumigène 1 (0 - 0.25 mg/mL) sur Figure 59 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de fumigène 4 (0 – 0,25 mg/mL) sur Figure 60 : Expression de l'ARN messager de la Mn SOD après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL Figure 61 : Expression de l'ARN messager de la Cu/Zn SOD après exposition à 0,1 et 0,25 Figure 63 : Expression de la protéine Mn SOD après exposition de 24h à 0,1et 0,25 mg/mL de Figure 64 : Expression de la protéine Mn SOD après exposition de 24h à 0,1et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1......168 Figure 65 : Expression de l'ARN messager de la catalase après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL Figure 66 : Expression de l'ARNm de l'hème oxygénase 1 (HO-1) après exposition à 0,1 et

Figure 67 : Expression de l'ARN messager de l'interleukine-6 après exposition à 0,1 e	et 0,25
mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 6h et 24h	170
Figure 68 : Expression de l'ARN messager de l'interleukine-8 après exposition à 0,1 e	et 0,25
mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 6h et 24h	171

Tableaux

Tableau 1 : Volume en pourcentage des différents éléments composant l'atmosphère 21
Tableau 2 : Émissions de CO ₂ dues à la combustion d'énergie dans le monde
Tableau 3 : Concentrations annuelles moyennes (μ g/m ³) de PM ₁₀ , de dioxyde d'azote et de
dioxyde de soufre pour les différentes régions du monde
Tableau 4 : Valeurs guides de l'OMS
Tableau 5 : Résumé des conseils d'experts en matière de polluants
Tableau 6 : Corrélation entre la visibilité et concentration de fumigène pour deux fumigènes
différents73
Tableau 7 : EEGL, PEGL, SPEGL et PPEGL concernant les fumigènes à base
d'hexachloroéthane et d'oxyde de zinc (HC/Zn)79
Tableau 8 : EEGL, PEGL, SPEGL et PPEGL concernant les fumigènes à base de phosphore
rouge (RP)
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes campagnes de prélèvement
Tableau 10 : Gamme d'étalonnage utilisée lors de l'analyse de la composition en métaux par
ICP-OES
Tableau 11 : Raies utilisées pour le dosage des métaux par ICP-OES91
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différentes analyses physico-chimiques effectuées sur
les particules de tir et de fumigènes95
Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées pour l'évaluation du stress oxydant et de
l'inflammation, taille de l'amplicon obtenu et température d'hybridation utilisée pour réaliser la
qPCR
Tableau 14 : Ensemble des données de prélèvements et concentrations des particules de tir.
Tableau 15 : Composition en métaux (ICP-OES) des particules issues de tir de petit calibre (9
mm) en mg/kg (campagne 2014)119
Tableau 16 : Composition en métaux (ICP-OES) des particules issues de tir de petit calibre (9
mm) en mg/kg (campagne 2015)120
Tableau 17 : Effet des particules de tir sur les différentes phases du cycle cellulaire des cellules
A549

Tableau 18 : Classe majoritaire de particules et pic d'émission associé lors de tir de fumigènes. Tableau 19 : Ensemble des données de prélèvements sur les différents étages des impacteurs Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différents fumigènes collectés sur le site d'expérimentation de la DGA lors des deux campagnes de prélèvements en octobre 2014 et Tableau 21 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 1 en mg/kg......147 Tableau 22 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 2 en mg/kg......148 Tableau 23 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 3 en Tableau 24 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 4 en mg/kg......150 Tableau 25 : Tableau récapitulatif des éléments métalliques majoritaires composants les Tableau 26 : Tableau récapitulatif des composés organiques majoritaires des particules issues Tableau 27 : Effet des particules du fumigène 1 (0,10 et 0,25 mg/mL) sur les différentes phases Tableau 28 : Effet des particules du fumigène 4 (0,10 et 0,25 mg/mL) sur les différentes phases

Annexes

Annexe 1 : Ensemble des données granulométrique par mesure pondérale des prélèvements
de particules de tir
Annexe 2 : Ensemble des données granulométrique par mesure pondérale des prélèvements
de particules des quatre fumigènes187
Annexe 3 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 1 par classe
granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm).
Annexe 4 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 1 par classe granulométrique

Annexe 4 : Quantite cumulee d'aerosol issu du fumigene 1 par classe granulometrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm).....189

Annexe 5 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 2 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μ m).

Annexe 6 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 2 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μ m).... 191 Annexe 7 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 3 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μ m).

Annexe 8 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 3 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 µm).... 193 Annexe 9 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 4 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 µm).

Annexe 14 : Composition en matière organique (GC/MS) des particules issues du fumigène 4.

Liste des abréviations

ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists ADN : Acide DésoxyriboNucléique AhR : Récepteur des Hydrocarbures Aromatiques ALI : Interface Air-Liquide ARN : Acide RiboNucléique ATP : Adénosine TriPhosphate AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive **BSA** : Bovine Serum Albumin BT : Bleu Trypan CAT: Catalase CCNUCC : Convention-Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques CAT : Catalase CH₄: Méthane CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer **CNR** : Conseil National de Recherche CO : Monoxyde de carbone CO₂ : Dioxyde de carbone COVs : Composés Organiques Volatiles CRP : C-Reactive Protein CuO: Oxyde de cuivre DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMSO : Diméthylsulfoxyde EC : Carbone Elémentaire ECVAM : Centre Européen pour la Validation de Méthodes Alternatives EEGL : Emergency Exposure Guidance Level EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique EO : Extrait organique EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène ETM : Eléments Traces Métalliques GAPDH : Glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase GES : Gaz à Effet de Serre GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-TCD : Gas Chromatography-Thermal Conductivity Detector GPx : Glutathion Peroxydase GSH : Glutathion réduit GSSG : Glutathion oxvdé H⁺: Ion hydrogène H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène H₂SO₄: Acide sulfurique H₃PO₄ : Acide phosphorique HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques HC ou HCE : Hexachloroéthane HCI: Acide Chlorhydrique 4-HHE : 4-hydroxy-2-hexenal HNO₃ : Acide nitrique HO-1 : Hème Oxygénase 1 HR : Humidité Relative IC₅₀: Concentration Inhibitrice médiane ICP-OES : Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry IL : Interleukine IFN : Interféron

KCI : Chlorure de potassium KCIO₃: Chlorate de potassium KCIO₄ : Perchlorate de potassium KNO₃ : Nitrate de potassium LAURE : Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire MCP-1 : Monocyte Chimoattractant Protein 1 MDA : Malondialdehyde MTT : (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazoliumbromide N₂O : Protoxyde d'azote (Oxyde nitreux) NF-kB : Nuclear Factor Kappa Bêta NH₃: Ammoniac NH₄CI : Chlorure d'ammonium NH₄NO₃: Nitrate d'ammonium NHBE : Normal Human Bronchial Epithelial cells NO : Monoxyde d'azote NO₂: Dioxyde d'azote NO₃⁻: Nitrates NOx : Oxydes d'azote Nrf-2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 O₂: Dioxygène O₂⁻ : Anion superoxide O3: Ozone OC : Carbone Organique OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économigues OH•: Radical hydroxyle 8-OHdG : 8-hydroxy-désoxyguanine OMS : Organisation Mondiale de la Santé ONOO⁻ : Peroxynitrite **ONU : Organisation des Nations Unies** PBS : Phosphate-Buffered Saline $Pb(N_3)_2$: Azoture de plomb PCB : PolyChloroBiphényles PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxines PCDF : PolyChloroDibenzo Furanes PEGL : Permissible Exposure Guidance Level PM : Particulate Matter $PM_{0.1}$: Particules $\leq a 0,1 \mu m$ PM_1 : Particules $\leq a 1 \mu m$ PM_{10} : Particules $\leq a 10 \ \mu m$ $PM_{2.5}$: Particules $\leq a 2.5 \mu m$ PPEGL : Permissible Public Exposure Guidance Level **PPM : Partie Par Million RIN : RNA integrity number RP**: Rouge Phosphore **RPM** : Rotation par minute **RT** : Reverse Transcriptase RT-qPCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction SDS : Sodium Dodecvl Sulfate SO₂ : Dioxyde de soufre SO₄²⁻ : Sulfates SOD (Mn; CuZn): SuperOxide Dismutase (manganese; cuivre-zinc) SPEGL: Short-term Public Emergency Guidance Level TiO₂ : Dioxyde de titane TNF-α : Tumor Necrosis Factor Alpha

TNT : 2,4,6-trinitrotoluene TPA : Acide Téréphtalique TSP : Particules Totales en Suspension TRS : Taux de Révertants Spontanés US-EPA : US Environnemental Protection Agency UV : Ultra-Violet VLE : Valeurs Limites d'Exposition VLEP : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelles WP : Phosphore blanc ZnCl₂ : Chlorure de zinc ZnO : Oxyde de zinc

Résumé

La pollution atmosphérique, et plus particulièrement la pollution particulaire d'origine anthropique constitue l'un des facteurs de risque environnemental les plus importants impliqués dans l'augmentation croissante de la morbi-mortalité liée aux pathologies respiratoires et cardio-vasculaires. Au cœur du domaine qu'englobent les activités pyrotechniques, que ce soit dans le domaine professionnel, civil ou militaire, les fumigènes sont référencés comme producteur important de particules et jouent donc un rôle non négligeable dans l'augmentation de cette pollution particulaire, exposant leurs utilisateurs aux différents aérosols émis.

L'objectif général de cette étude exploratoire a été d'apporter des connaissances sur les caractéristiques physico-chimiques ainsi que sur la toxicité pulmonaire *in vitro* de particules émises lors d'activités pyrotechniques, et plus précisément de particules issues d'armes de petit calibre et de fumigènes.

La caractérisation physico-chimique a démontré les particules de tir possédaient une granulométrie assez grossière (entre 3 et 7,5 µm) et étaient composées majoritairement d'éléments métalliques ; contrairement aux particules de fumigène qui appartiendraient à la classe granulométrique des particules fines (< 0,95 µm) et qui seraient majoritairement composées de molécules organiques différentes selon le type de fumigène. L'évaluation de la toxicité a été réalisée par une approche *in vitro* en utilisant des cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) exposées aux particules de tir et de fumigènes. Une étude de mutagénicité a été conduite à partir d'extraits organiques des particules de fumigènes. Parmi les particules testées, les particules de tir et du fumigène 1 ont induit une cytotoxicité. Les particules de fumigène 1 ont également induit un stress oxydant (augmentation de l'expression de l'ARNm de HO-1), une initiation de la réponse inflammatoire (augmentation de l'expression de l'ARNm d'IL-6 et IL-8) et des effets mutagènes.

Les résultats de cette étude comparative ont démontré que les particules issues d'armes de poing et de fumigènes avaient une granulométrie, une concentration atmosphérique ainsi qu'une composition chimique différentes ; caractéristiques physico-chimiques responsables d'effets mutagènes et cytotoxiques différents ainsi que d'altérations des propriétés oxydantes et inflammatoires intrinsèques. Cette étude a mis en évidence la nécessité d'évaluer la toxicité des particules issues d'activités pyrotechniques en développant des moyens expérimentaux adaptés, depuis la collecte des particules jusqu'à l'évaluation de leurs impacts sanitaires.

Mots clés : Particules, pyrotechnie, toxicité, physico-chimie, in vitro.

Abstract

Air pollution, and particulary anthropogenic particulate matter, is one of the most important risk factors involved in the high rate of morbidity and mortality related to respiratory and cardiovascular diseases. In pyrotechnic field, be it professional, civil or military activities, smokes constitue an important particle producer playing a major role in particulate matter emmergence and thereby exposing users to the various emitted aerosols.

The main purpose of this exploratory study was to provide knowledge on the physicochemical characteristics of particles emitted during pyrotechnic activities, more specifically particles from gunfire and smokes, and to assess their pulmonary toxicity *in vitro*.

On the first hand, the physicochemical characterization demonstrates that firing particles had a rather coarse granulometry (3 to 7.5 μ m) and were mainly composed of metallic elemets, despite smoke particles belong to the category of fine particles (< 0,95 μ m) and are predominantly composed of different organic molecules according to the smoke type.

On the other hand, in order to assess the pulmonary toxicity of particles, we exposed human alveolar epithelial cells (A549) *in vitro* to particles coming from either gunfire and to two of the four different smokes (smoke 1 and 4). The results of this study showed that some of these particles (gunfire and smoke 1 particles) induced a mutagenic effects from organic extracts, as well as cytotoxicity. Moreover, particles of smoke 1 were also able to give rise to an oxidative stress (increased HO-1 mRNA expression) and to initiate an important inflammatory response characterized by pro-inflammatory cytokine upregulation (increase in IL-6 and IL-8 mRNA expression).

The results of this comparative study demonstrated that particles from gunfire and smoke have different particle sizes and chemical composition. These physicochemical characteristics are responsible for different mutagenic and cytotoxic effects as well as alterations of the intrinsic oxidizing and inflammatory properties. This study also made it possible to understand the different methods of toxicological evaluation of smoke particles.

Keywords : Particles, pyrotechnics, physico-chemical, toxicity, in vitro.

Introduction

I- Pollution atmosphérique

1- Définition

L'explosion démographique mondiale associée à l'hyper développement des activités humaines industrielles et agricoles ainsi que l'accroissement du parc automobile dans la majorité des pays développés ou en cours de développement ont entraîné une modification de notre environnement, de notre écosystème et de l'atmosphère. Depuis les épisodes de surmortalité des années 50, la pollution atmosphérique d'origine anthropique a été reconnue comme un facteur de risque majeur pour la santé et est donc devenue, par la suite, une problématique de préoccupation croissante au niveau mondial.

Aujourd'hui, la définition de référence mondiale est celle promulguée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui entend par pollution de l'air, la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère. Cette définition actuelle est le fruit de nombreuses définitions qui ont été proposées depuis près de 50 ans.

La première de ces définitions a été éditée en mars 1968 dans la déclaration du Conseil de l'Europe, qui définit la pollution atmosphérique en énonçant qu'« il y a pollution atmosphérique lorsque la présence d'une substance étrangère ou une variation importante dans la proportion de ses composants est susceptible de provoquer un effet nocif, compte tenu des connaissances scientifiques du moment, ou de créer ou une nuisance ou une gêne ».

15 ans plus tard, en février 1983, la Loi n°83-03 relative à la protection de l'environnement ajoute quelques nuances à la définition précédente en définissant la pollution atmosphérique comme « l'émission dans l'atmosphère de gaz, de fumée ou de particules solides ou liquides, corrosives, toxiques ou odorants de nature à incommoder la population, à compromettre la santé ou la sécurité publique ou à nuire aux végétations, à la production agricole et aux produits agroalimentaires, à la conservation des constructions et monuments ou au caractère des sites ».

En 1994, l'Organisation de Coopération et de Développement Économique définit la pollution atmosphérique comme « L'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans l'atmosphère qui entraînent des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes écologiques, à gêner les autres utilisations légitimes de l'environnement ».

En ce qui concerne la France, il a fallu attendre le 30 décembre 1996 pour que cette définition soit précisée dans la législation. La loi LAURE (Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie) met en évidence de manière explicite le rôle de l'homme dans la pollution

atmosphérique en définissant celle-ci comme « (...) l'introduction par l'homme, directement ou indirectement dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives ».

Bien que cette définition ne tienne compte que des activités anthropiques, étant en général les activités les plus productrices de polluants aériens, les sources naturelles de pollution, telles les éruptions volcaniques, la décomposition naturelle ou bien encore les feux de végétation peuvent contribuer à l'altération de la qualité de l'air.

Malgré ces définitions exhaustives, la pollution atmosphérique reste néanmoins difficile à évaluer compte tenu de la diversité des polluants, de leurs combinaisons, des modifications et de leurs interactions dans l'atmosphère notamment sous l'effet de réactions photochimiques. C'est pourquoi la notion de qualité de l'air est apparue et est définie par la diversité ainsi que la concentration de polluants dans l'air ; concentrations fluctuant selon les sources d'émission, les conditions météorologiques (vent, pluie, soleil, température) et la topographie locale. La plupart des sources de pollution de l'air extérieur échappent totalement au contrôle des individus et du fait de corrélations démontrées entre l'élévation du nombre d'hospitalisations liées à des affections pulmonaires ou cardiaques et l'augmentation des taux de polluants atmosphériques^{1,2}, il est donc nécessaire que les décideurs locaux, nationaux et internationaux, prennent des mesures dans des secteurs comme les transports, les activités industrielles, la gestion des déchets, le logement et l'agriculture afin de limiter les effets toxiques de cette pollution atmosphérique globale³.

2- Composition de l'atmosphère

L'atmosphère est l'enveloppe gazeuse entourant le globe terrestre, animée du même mouvement et de la même vitesse que la Terre. Ayant une épaisseur d'environ 1000 km, l'atmosphère peut être subdivisée en différentes couches non homogènes déterminées par plusieurs propriétés physiques telles que la pression, la température, la densité. L'atmosphère se compose de quatre couches successives, de bas en haut : la troposphère, la stratosphère, la mésosphère et la thermosphère. Ces couches sont respectivement séparées par trois zones d'inversions thermiques : la mésopause, la stratopause et la tropopause⁴. La troposphère, 1^{ère} et principale couche de l'atmosphère, se délimite par les 16 premiers kilomètres en partant de la Terre et contient 80 à 90% de la masse totale de l'air et la quasi-totalité de la vapeur d'eau ce qui justifie une pression et une densité maximale. La température y décroît avec l'altitude (jusqu'à -50°C) et c'est la strate où se produisent les différents phénomènes météorologiques (nuage, pluie) et mouvements atmosphériques horizontaux et verticaux (convection thermique,

vent). La composition chimique de l'atmosphère comprend pour l'essentiel, de l'azote (78%), de l'oxygène (21%), des gaz rares (Argon, Néon, Hélium...) (<1%) et dans les basses couches, de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone (Tableau 1). L'ensemble des gaz dont les proportions restent constantes, forme l'air.

Gaz constituants de l'air sec	Volumes (en %)	Masses molaires (O = 16,000)
Azote (N ₂)	78,09	28,016
Oxygène (O ₂)	20,95	32,000
Argon (A)	0,93	39,944
Dioxyde de carbone (CO ₂)	0,035	44,010
Néon (Ne)	1,8 10 ⁻³	20,183
Hélium (He)	5,24 10 ⁻⁴	4,003
Krypton (Kr)	1,0 10 ⁻⁴	83,07
Hydrogène (H ₂)	5,0 10 ⁻⁵	2,016
Xénon (Xe)	8,0 10 ⁻⁶	131,3
Ozone (O ₃)	1,0 10 ⁻⁶	48,000
Radon (Rn)	6,0 10 ⁻¹⁸	222,00

Tableau 1 : Volume en pourcentage des différents éléments composant l'atmosphère⁴.

D'un point de vue thermodynamique, l'air atmosphérique peut être considéré comme un mélange de deux gaz : l'air sec et la vapeur d'eau. Le manque de convection avec la stratosphère et une différence de pression significative crée une sorte de barrière invisible provoquant l'accumulation des différents polluants naturels et anthropiques émis depuis la Terre. La seconde couche remarquable par sa composition physique et chimique, se situe au sein de la stratosphère ; c'est la couche d'ozone. Cette couche joue un rôle essentiel dans la protection de la surface terrestre des rayonnements ultraviolets de par son épaisseur variable tout autour de la Terre. En effet, l'ozone (O_3) de la stratosphère est créé par les ultraviolets frappant les molécules de dioxygène (O_2), les scindant en deux atomes distincts ; un atome d'oxygène se combine ensuite avec une autre molécule de dioxygène (O_2) pour former l'ozone (O_3).

 O_2 + rayonnement solaire \rightarrow O + O et O + $O_2 \rightarrow O_3$

3- Pollution locale, régionale et globale

La pollution atmosphérique peut-être déclinée selon trois niveaux : local, régional et planétaire / global.

a. La pollution atmosphérique locale

La pollution atmosphérique locale, ou encore appelée de proximité, est caractérisée par une pollution retrouvée en proximité des sources d'émissions, essentiellement en milieu urbain. Elle est due aux activités humaines telles que les activités industrielles, le transport routier, les émissions liées aux habitations. Les polluants issus de ces sources anthropiques sont en grande majorité des dérivés métalliques, qui peuvent être adsorbés sur les particules, les

dérivés oxydés comme le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NOx) ou encore les dérivés carbonés comme les composés organiques volatils (COVs), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), le carbone élémentaire ou carbone suie. Cette pollution a une conséquence directe sur la santé de la population locale et son écosystème environnant (végétation, exploitation agricole, qualité de l'eau)⁵.

b. La pollution atmosphérique régionale

La pollution atmosphérique régionale se produit dans des zones distantes de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de kilomètres des sources de pollution. Cette seconde forme de pollution résulte de phénomènes physico-chimiques plus ou moins complexes à l'origine de la formation de polluants dans l'atmosphère dits « secondaires » tels que O_3 , l'acide sulfurique ou encore l'acide nitrique, à partir de polluants dits « primaires » que sont les oxydes de soufre et d'azote. Elle est à l'origine des retombées sur les écosystèmes de composés acides ou acidifiants sous l'effet des vents et des précipitations, prenant leur source d'émission au niveau des villes et des campagnes (engrais chimiques agricoles, feux naturels, industries, etc). Cette pollution atmosphérique régionale est également à l'origine de la formation d'O₃ et d'autres composés oxydants à partir des NOx, COVs et de CO⁶.

c. La pollution atmosphérique planétaire / globale

La pollution atmosphérique planétaire ou globale est définie par une pollution qui aurait comme conséquence le dérèglement de l'écosystème terrestre et contribuerait aux changements climatiques. La conséquence la plus parlante et la plus préoccupante de cette pollution est le réchauffement climatique, principalement provoqué par l'augmentation accrue des concentrations de gaz à effets de serre (GES) dans l'atmosphère.

Du fait de la présence d'une pollution diffuse ou transfrontalière, une harmonisation internationale des réglementations s'est mise en place à partir de la fin des années 1970.

Le 13 novembre 1979, la convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance a fait voter les premières lois portant sur l'élaboration de politiques appropriées, l'échange d'informations, la réalisation d'activités de recherche et sur la mise en œuvre et le développement de mécanismes de surveillance de la qualité de l'air. Les États membres de cette convention se sont engagés, par leurs politiques et stratégies nationales, à limiter, à prévenir et à réduire progressivement leurs rejets de polluants atmosphériques et, de ce fait, à lutter contre la pollution transfrontière. Suite à cette convention, une multitude de protocoles additionnels et de conventions ont vu le jour afin d'assurer plus efficacement la lutte internationale contre la pollution atmosphérique.

La Convention de Vienne sur la protection de la couche d'ozone, adoptée le 22 mars 1985, reconnait la nécessité d'accroître la coopération internationale en vue de limiter les risques

que les activités humaines pouvaient faire courir à la couche d'ozone. En complément de cette convention, le protocole de Montréal fût adopté, visant à réduire la consommation de chlorofluorocarbures et à arrêter la consommation des autres dérivés halogénés, reconnus comme principaux responsables de la destruction de la couche d'ozone.

La Convention-cadre des Nations unies sur les changements climatiques (CCNUCC) a été adoptée au cours du Sommet de la Terre de Rio de Janeiro en 1992 par 154 pays et la totalité des membres de la Communauté européenne en mars 1994. La CCNUCC est la première tentative, dans le cadre de l'Organisation des Nations Unies (ONU), permettant de mieux cerner ce qu'est le changement climatique et comment y remédier.

Le protocole de Kyoto, négocié en 1997 et mis en vigueur en 2005, est un accord international visant à la réduction, d'au moins 5 % par rapport au niveau de 1990, des émissions de six gaz à effet de serre : dioxyde de carbone, méthane, protoxyde d'azote et trois substituts des chlorofluorocarbones. Malheureusement, les trois pays les plus pollueurs au monde (États-Unis, Chine et Inde) ne s'étant pas engagés à réduire leurs émissions, les effets visibles de ce protocole en ont été diminués. Les engagements de Kyoto ont pris fin début 2013.

De nos jours, le secteur des transports contribue fortement au changement climatique en représentant 25% des émissions mondiales de dioxyde de carbone. Les différents gouvernements tendent à favoriser et à développer un système de transport multimodal, privilégiant l'utilisation des transports publics ainsi que la réduction des émissions du parc automobile par la mise en place de réglementations et de systèmes de dépollution comme par exemple le catalyseur d'oxydation et les filtres à particules. En effet, comme le montre la figure 1 ci-dessous, les émissions du parc automobile français sont en nette diminution depuis les années 2000, que ce soient les émissions de particules, de NO₂ ou bien encore de SO₂ (Figure 1).



Figure 1 : Évolution des concentrations en SO₂, NO₂, O₃ et PM₁₀ en France entre 2000 et 2015⁷.

Ces plans gouvernementaux à l'échelle planétaire permettent de réduire considérablement la pollution de l'air urbain et les émissions de GES, permettant de protéger l'environnement et la santé^{8,9}.

On observe également une augmentation des émissions mondiales de dioxyde de carbone (CO₂), de méthane (CH₄), de protoxyde d'azote (N₂O) et des gaz halogénés résultant directement de l'activité anthropique, contribuant grandement à la diminution de la couche d'ozone stratosphérique ; couche permettant de protéger la Terre des rayons ultra-violets (UV) émis par le soleil, cancérigène pour l'homme.

La forte proportion de personnes exposées à la pollution atmosphérique fait de la pollution atmosphérique urbaine un problème majeur de santé publique. Künzli et son équipe ont réalisé une estimation quantitative du nombre de décès dus à la pollution atmosphérique dans trois pays, que sont la France, la Suisse et l'Autriche. Cette étude a permis de conclure que 6 % des décès totaux de ces pays seraient attribuables à la pollution atmosphérique et la pollution liée au transport en expliquerait la moitié, soit 20 000 décès annuels pour ces trois pays¹⁰.

4- Sources de pollution

Le terme pollution atmosphérique désigne un mélange complexe et hétérogène de polluants présents à des concentrations variables dans l'atmosphère. Le recensement des sources d'émission de ces différents polluants est d'une importance capitale d'un point de vue politicoéconomique¹¹. En effet, connaître la contribution des différents secteurs en termes d'émission de polluants permet de mettre en place des politiques de réductions des émissions plus efficaces en étant mieux ciblées. Cette connaissance est également à la base des taxations en cas de dépassement de plafonds réglementaires (règlementation d'émission du CO_2)¹². Les sources d'émission de polluants atmosphériques peuvent être classées selon plusieurs catégories : les sources anthropiques ou naturelles, fixes ou mobiles, ponctuelles ou diffuses¹³. Les particules participent à la pollution mobile par le biais de transport par différents moyens, comme le vent, les nappes phréatiques ou encore les nuages adsorbant les composés métalliques et autres HAPs/COVs se trouvant potentiellement dans l'atmosphère.

Les sources d'origine naturelle sont définies comme induisant des rejets de substances polluantes mais qui ne sont pas liées à l'activité humaine. Ces sources naturelles regroupent une grande diversité de polluants tels que des composés soufrés (issus d'éruptions volcaniques), des composés carbonés (issus de feux de végétation, de décomposition organique), des particules minérales (embruns marins, érosion des roches), des particules biogéniques, liées à la présence d'organismes vivants (champignons, virus, pollens, bactéries) ou encore des gaz (CH₄, CO₂). Ces sources produisent une quantité non négligeable de polluants atmosphériques et ne peuvent donc être ignorées. Malheureusement, il est impossible de les contrôler contrairement à la pollution anthropique, qui elle, peut être maîtrisée, entre autres par la réglementation et qui représente tout de même la grande majorité de la composante de la pollution atmosphérique.

Les sources anthropiques sont le fait d'activités humaines. L'industrialisation mondiale pousse les pays développés et en cours de développement à l'utilisation des combustibles fossiles (pétrole, gaz naturel et charbon) qui constituent la principale source des polluants d'origine anthropique. En effet, l'utilisation de ces combustibles comble à eux seuls environ 80% des besoins énergétiques mondiaux et se concentrent, en majorité, en milieu urbain. Parmi les sources anthropiques, on oppose souvent les sources fixes aux sources mobiles. Les sources fixes sont principalement issues des mécanismes de combustion consistant en une oxydation du carbone organique et des impuretés des combustibles ainsi que de l'azote de l'air amenant à la formation de COVs, de SO₂, des NOx et de particules. Les sources fixes sont diverses et variées comme par exemple les installations individuelles ou industrielles de combustibles permettant chauffage et apport d'énergie, les installations de traitements des déchets et les installations industrielles (pétrochimie, métallurgie). Contrairement aux sources fixes, les sources mobiles sont liées aux activités de transports, que ce soit maritime, aérien ou encore routier. Le transport routier est la principale source de pollution mobile à cause de la combustion de carburants, essence ou Diesel, produisant des échappements contenant des particules, des COVs, du CO et des NOx ; représentant 93% des GES produits par la totalité des activités de transports¹⁴. En effet, on observe que depuis 1960, la production de NO_x par le transport routier a plus que doublé, passant de 20% à 49% de 1960 à 2003. Malgré la diminution de la part de production des COVs par le trafic routier, ce dernier en est tout de même responsable à hauteur de 24% en 2003 (Figure 2).



Figure 2 : Répartition par secteur des émissions de quelques polluants atmosphériques en France (en %) de 1960 et 2003. TSP : Particules Totales en Suspension¹⁵.

Les sources de pollution englobent deux autres sous-groupes, la pollution ponctuelle et diffuse. La pollution ponctuelle provient d'un point unique et identifiable, comme c'est le cas pour les émanations d'une usine. Ce type de pollution est considéré comme extrêmement polluant à court terme et a été fortement réduit au cours des dernières décennies par la mise en place de plusieurs programmes gouvernementaux afin de diminuer les rejets polluants issus du secteur industriel dans l'environnement.

La pollution diffuse est la pollution la plus répandue et la plus néfaste de nos jours. Ce type de pollution contamine l'air, le sol et l'eau sur de longues périodes, par de petites doses répétées sur de grandes superficies. La pollution diffuse est plus difficile à contrôler que la pollution ponctuelle étant liée à une multitude de sources réparties sur l'ensemble d'un territoire. Les

installations de chauffages du secteur résidentiel représentent un exemple illustrant parfaitement la pollution diffuse (Figure 3).



Figure 3 : Source et échelle de la pollution atmosphérique.

Une fois formées, la durée de séjour ainsi que le transport dans l'atmosphère des particules atmosphériques d'origine anthropique ou naturelle sont conditionnés par leur composition chimique, leur taille ainsi que par les différents paramètres météorologiques avec lesquels elles peuvent être mises en contact comme par exemple le vent, l'humidité ou bien encore les diverses précipitations. L'élimination des particules atmosphériques se fait par différents mécanismes que l'on appelle dépôts secs ou dépôts humides. Adapté de ¹⁵.

5- Polluants atmosphériques

L'air atmosphérique résulte d'une composition chimique extrêmement diversifiée et stable si nous la considérons dans son état sain, c'est-à-dire sans pollution ou apport de composés chimiques anthropiques. Avec l'entrée en jeux des sources de pollutions anthropiques et naturelles formant un mélange très complexe et difficilement identifiable, les caractéristiques physico-chimiques de l'atmosphère s'en trouvent modifiées. Ces différents polluants ayant des durées de vie dans l'atmosphère différentes, ceci explique que les problèmes de pollution se situent sur des échelles de temps et d'espace très variables. Cette pollution atmosphérique qui bouleverse l'équilibre naturel de l'atmosphère est composée de polluants appartenant à deux catégories différentes : les polluants primaires et les polluants secondaires.

a. Les polluants primaires

Les polluants primaires sont les polluants issus directement d'une source d'émission et émis dans l'atmosphère. Les activités humaines de productions industrielles et énergétiques sont, avec les transports, les principales sources de polluants primaires produisant du CO, du CO₂, du SO₂, des NOx, des hydrocarbures, des métaux lourds ainsi que des particules.

Le monoxyde de carbone (CO)

Le CO est un gaz incolore, inodore, inflammable et insipide. Étant le produit de la combustion incomplète de toute matière organique, incluant les combustibles fossiles (dérivés du pétrole, charbon, gaz naturel) utilisés comme carburants énergétiques, le monoxyde de carbone est un des polluants atmosphériques qui se retrouve en grande proportion en milieu urbain. En effet, la principale source anthropique de CO est de loin le trafic automobile. Le CO a également un effet toxique, asphyxiant chez l'homme, à partir d'une concentration en volume inférieure à 0,1%, en exposition prolongée¹¹. Dans l'atmosphère, il participe aux mécanismes de formation de l'ozone troposphérique et peut se transformer en CO₂, un des plus importants GES.

Le dioxyde de carbone (CO₂)

Le dioxyde de carbone représente 77% des émissions de GES d'origine humaine. Il résulte essentiellement de la combustion des énergies fossiles et du changement d'utilisation des sols (agriculture et déforestation). Il est surtout issu du secteur des transports (combustion de carburants), de l'industrie (utilisation d'énergies fossiles) et de l'habitat (utilisation d'énergie pour le chauffage et l'éclairage). Les émissions de CO₂ sont de plus en plus contrôlées dans les différentes régions du globe, de par le fait que leur augmentation est associée à l'industrialisation. Les pays développés tendent à mettre en place de nombreuses mesures afin de diminuer leurs fortes émissions de CO₂, alors que les pays en voies de développement voient ce taux s'accroître en parallèle de leur industrialisation, amenant le taux d'émission de CO₂ mondial à fortement augmenter depuis les années 1990 (Tableau 2).

en Mt CO ₂ ¹	1990	2009	2010	Part 2010 (%)	Évolution (%) 2010/2009	Évolution (%) 2010/1990
Amérique du Nord	5 566	6 110	6 322	20,9	+3,5	+13,6
dont : Canada	433	525	537	1,8	+2,1	+24,0
États-Unis	4 869	5 185	5 369	17,7	+3,5	+10,3
Amérique latine	609	1 058	1 135	3,7	+7,3	+86,3
dont : Brésil	194	338	388	1,3	+14,7	+99,6
Europe et ex-URSS	7 946	6 246	6 466	21,4	+3,5	-18,6
dont : UE à 27	4 050	3 571	3 660	12,1	+2,5	-9,6
UEà15	3 081	2 912	2 972	9,8	+2,1	-3,6
dont : Allemagne	950	747	762	2,5	+1,9	-19,8
Espagne	205	282	268	0,9	-5,0	+30,7
France	352	351	358	1,2	+1,8	+1,6
Italie	397	389	398	1,3	+2,3	+0,3
Royaume-Uni	549	466	484	1,6	+3,9	-12,0
12 nouveaux États membres	969	659	688	2,3	+4,4	-29,0
dont : Russie	2 179	1 520	1 581	5,2	+4,0	-27,4
Afrique	544	931	930	3,1	-0,1	+70,8
Moyen-Orient	591	1 547	1 614	5,3	+4,3	+173,3
Extrême-Orient	4 817	11 610	12 295	40,6	+5,9	+155,3
dont : Chine	2 244	6 846	7 259	24,0	+6,0	+223,5
Corée du Sud	229	515	563	1,9	+9,2	+145,6
Inde	582	1 564	1 626	5,4	+4,0	+179,2
Japon	1 064	1 096	1 143	3,8	+4,3	+7,4
Océanie	283	415	414	1,4	-0,2	+46,2
Monde	20 974	28 947	30 276	100,0	+4,6	+44,4

Émissions de CO₂ dues à la combustion d'énergie dans le monde

1 : Million de tonnes de CO₂ (données non corrigées des variations climatiques).

Tableau 2 : Émissions de CO₂ dues à la combustion d'énergie dans le monde¹⁶.

Le dioxyde de soufre (SO₂)

Le SO₂ est un gaz incolore, dont l'odeur est âcre, et fortement irritante lors d'inhalation. Il est émis par les sources de pollution naturelle, essentiellement lors des éruptions volcaniques et dans une proportion plus grande, par les sources de pollution anthropique. La principale source de SO₂ est la combustion d'éléments contenant du soufre tels que les combustibles fossiles (charbons, fuels, pétrole) qui contiennent entre 1 et 5% de soufre faisant du SO₂ un bon indicateur de la pollution industrielle¹⁷. Il existe également d'autres sources moins importantes, que sont les installations de chauffage domestique ou bien encore les activités métallurgiques qui sont essentiellement responsables des pluies acides par le fait des émissions d'effluents soufrés. Dans les pays développés, les émissions non naturelles de SO₂ sont en diminution constante et de façon exponentielle depuis les années 1980. Néanmoins, les émissions dans l'atmosphère de SO₂ venant de l'Europe représentent tout de même 9,6 % des émissions globales¹⁸. Malgré les réglementations des pays développés qui obligent le retrait de la majeure partie du soufre dans les carburants lors du processus de raffinage, les pays en cours de développement peinent à respecter ces réglementations et contribuent grandement à la persistance du SO₂ atmosphérique.

Les oxydes d'azote (NOx)

Les NOx atmosphériques sont composés essentiellement de protoxyde d'azote (N₂O), de monoxyde d'azote (NO) et de dioxyde d'azote (NO₂). Les NOx se forment à partir de l'azote (N) et du dioxygène atmosphérique essentiellement lors de combustions. La source majeure de NOx est le trafic routier à hauteur de 60%, avec un parc automobile composé en grande partie de véhicules Diesel produisant du NO et transformant celui-ci en NO₂ par l'intermédiaire du catalyseur d'oxydation. Les installations de chauffage domestique se positionnent en seconde place juste derrière le trafic routier. Les NOx sont donc un indicateur de pollution relatif à l'industrialisation et au trafic routier. Le NO et NO₂ sont tous deux des gaz toxiques pour l'homme et se retrouvent en forte concentration en milieu urbain malgré des réglementations très strictes. Ils sont également impliqués dans la formation de l'ozone troposphérique engendrant une pollution dite photo-oxydante¹⁹.

Les composés organiques volatiles (COVs)

Les COVs regroupent un grand nombre de substances carbonées, appartenant à différentes familles chimiques (hydrocarbures aromatiques, cétones, alcools, alcanes, aldéhydes, etc), associés à d'autres éléments de l'atmosphère. Ce sont des gaz d'origine anthropique provenant de combustion incomplète et de l'évaporation de solvants organiques lors de leur fabrication et utilisation. Ils peuvent également être émis naturellement par les végétaux et certaines fermentations. Les COVs ont la caractéristique d'être extrêmement volatils ce qui leur confère l'aptitude de se diffuser très rapidement dans l'atmosphère et plus ou moins loin de leur lieu d'émission, entraînant ainsi des impacts directs et indirects sur notre écosystème. Le benzène et le toluène sont les COVs retrouvés le plus fréquemment en milieu urbain ce qui en fait de très bons marqueurs de la pollution atmosphérique au sein des grandes agglomérations.

Les métaux lourds

Les métaux lourds désignent en général les métaux dont le poids atomique est supérieur à celui du fer. Ces métaux sont parfois également désignés par le terme de métaux traces ou d'éléments traces métalliques. On considère en général d'un point de vue toxicologique les métaux lourds suivants : Arsenic (As), Cadmium (Cd), Chrome (Cr), Cuivre (Cu), Mercure (Hg), Nickel (Ni), Plomb (Pb), Sélénium (Se), Zinc (Zn). Ils ont une conductivité électrique élevée. Néanmoins, quelques métaux se distinguent des autres par le fait qu'ils sont considérés comme des oligo-éléments, c'est-à-dire qu'ils sont bénéfiques à faible dose pour l'organisme et toxiques à forte dose. C'est le cas par exemple du cuivre, zinc, sélénium et manganèse qui sont des oligo-éléments essentiels par opposition au mercure, au plomb ou encore au cadmium qui ont un caractère non-indispensable. Les sources de ces métaux sont

principalement anthropiques et liées aux activités métallurgiques, industrielles ainsi qu'au trafic routier. Du fait de leur difficulté à être dégradés sans traitement spécifique, les métaux ne posent pas seulement un problème pour la pollution de l'air, mais aussi un problème écologique concernant notamment la qualité de l'eau et des sols.

Les particules en suspension

Le terme particules en suspension ou matière particulaires (« Particulate Matter, PM ») regroupe une variété importante de substances organiques ou minérales, liquides ou solides, en suspension dans l'atmosphère. Les particules en suspension proviennent aussi bien de sources naturelles, comme les éruptions volcaniques, les poussières désertiques ou bien les microorganismes que de sources anthropiques que sont le trafic automobile, le chauffage domestique, les activités industrielles et métallurgiques, le traitement des déchets. Les sources anthropiques constituent la grande majorité des sources d'émissions des PM. Les PM sont généralement classées en trois catégories en fonction de leur granulométrie ; les PM₁₀ de diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm, les PM_{2.5} (particules fines) d'un diamètre inférieur à 2,5 µm et les PM_{0.1} (particules ultrafines) ayant une taille comprise entre 0,001 et 0,1 µm. Dans l'atmosphère, les particules les plus fines (PM_{0.1}) ne représentent qu'une faible masse mais constituent en nombre, près de 70 à 80% des particules de l'air extérieur. Les particules feront l'objet du chapitre II.

Ainsi, l'ensemble de ces polluants majeurs constitue la problématique actuelle de la qualité de l'air dans le monde en particulier au niveau urbain où se concentre la majorité des sources de pollution. Cependant, de grandes disparités sont observées entre les taux de pollution des différentes régions du monde, notamment dans les pays en voies de développement qui regroupent les plus fortes concentrations de polluants primaires (Tableau 3).

Régions	Movenne des concentrations annuelles					
	Dioxyde de soufre	Oxydes d'azote	РМ10			
Afrique	10-100	35-65	40-150			
Asie	6-65	20-75	30-220			
Australie/Nouvelle Zélande	3-17	11-28	28-127			
Canada/États-Unis	9-35	35-70	20-60			
Europe	8-36	18-57	20-70			
Amérique latine	40-70	30-82	30-129			

Tableau 3 : Concentrations annuelles moyennes (μg/m³) de PM₁₀, de dioxyde d'azote et de dioxyde de soufre pour les différentes régions du monde.

Ces résultats se basent sur une sélection de données urbaines¹³.

En effet, les continents asiatique, africain et l'Amérique latine représentent les trois continents produisant le plus de dioxyde de soufre, d'oxyde d'azote et de PM₁₀.

> Autres

On retrouve également les « dioxines », qui désignent deux familles de composés aromatiques PolyChloroDibenzo-p-Dioxines tricycliques halogénés : les (PCDD) et les PolyChloroDibenzoFuranes (PCDF). Ils sont chimiquement très stables, même en milieu acide, et se décomposent thermiquement à des températures de l'ordre de 800 à 1 000°C. De plus, ces molécules présentent une forte tendance à s'adsorber à la surface des particules atmosphériques, même si leur quantification est rarement réalisée en raison de la complexité matricielle²⁰. Ces composés sont libérés dans l'environnement à très faibles doses à partir de divers processus anthropogéniques (incinération des déchets ménagers et hospitaliers, la production d'acier, la combustion d'énergies fossiles, le chauffage au bois traité, la production d'électricité et la fumée de tabac), mais aussi par des causes naturelles (feux de forêt et les éruptions volcaniques). Des données récentes suggèrent des effets hormonaux, immunitaires et sur le cancer après des expositions à long terme²¹.

La classe des PolyChloroBiphényles (PCB) est également retrouvée dans l'atmosphère, constituant l'une des familles de composés organochlorés les plus présentes dans l'environnement en raison de leur utilisation importante et de leur résistance à la dégradation. Ceci entraîne une contamination non négligeable des chaînes alimentaires.

Les HAPs retrouvés dans l'air proviennent principalement de la combustion de matières carbonées, y compris de biomasse comme les bio-carburants, le Diesel et le bois, entraînant souvent des pics d'exposition pendant les mois d'hiver. Des experts ont reconnu la difficulté d'évaluer quantitativement les effets sur la santé dus aux mélanges d'HAPs et ont reconnu que, à des fins indicatives, le benzo(a)pyrène pouvait être considéré comme indicateur quantitatif des HAPs.

b. Les polluants secondaires

Les polluants secondaires sont des polluants qui ne sont pas émis directement dans l'atmosphère, mais qui résultent de la transformation physico-chimique des polluants primaires, avec des éléments naturels de l'air, au cours de leur séjour dans l'atmosphère.

L'ozone troposphérique (O₃)

Au niveau de la troposphère, l'O₃ est l'un des principaux polluants secondaires. En effet, ce dernier est indépendant des sources naturelles et anthropiques. Il est formé à partir de polluants primaires par oxydation photochimique, notamment à partir des NOx et des COVs, sous l'action des rayons du soleil. L'ozone est un puissant oxydant qui résulte de la réaction de recombinaison d'un atome d'oxygène (O) avec une molécule de dioxygène (O₂). Dans la troposphère, l'atome d'oxygène nécessaire est introduit par photodissociation du NO₂, sous l'action du rayonnement solaire (1). En milieu non pollué, le NO formé réagit avec l'O₃ pour former le NO₂ (2). Il existe ainsi un ensemble de réactions, un cycle de formation/dégradation de l'ozone, conduisant à un équilibre entre NO₂, NO et O₃. En milieu pollué, notamment dans les grandes agglomérations, le cycle équilibré NOx/O₃ est perturbé par la présence de COVs qui déplacent l'équilibre vers une plus grande formation de l'O₃¹⁵.

(1) NO₂ + hv => NO + O et O + O₂ => O₃ (2) NO + O₃ => NO₂ + O₂

Même si cet ozone est dégradé rapidement en NO₂ en quasi-totalité par la production importante de ses précurseurs (NO) par le biais des activités humaines, cela reste un problème majeur en région péri-urbaine, où le NO se retrouve en concentration plus faible, ce qui conduit à l'accumulation de l'ozone, plus difficilement dégradé. Cette préoccupation est d'autant plus importante que l'ozone est un gaz pro-oxydant nocif pour l'homme qui pénètre facilement jusqu'aux voies respiratoires profondes. La concentration de ce polluant est passée de 10 ppm en 1874 à 50 ppm dans les années 2000. C'est seulement depuis 2005, suite aux différentes réglementations mises en place par la majorité des grandes puissances, que la concentration de l'ozone troposphérique a enfin cessé d'augmenter en Europe et Amérique du Nord. En Europe, on considère cependant que l'ozone reste un polluant préoccupant malgré sa diminution progressive de façon générale depuis 2006 ^{22,23}.

\succ Les nitrates (NO₃⁻)

Les nitrates (NO₃⁻) sont des ions minéraux de l'acide nitrique, éléments nutritifs essentiels pour les végétaux. Leur formation est très fortement liée aux activités anthropiques, notamment par le phénomène de combustion qui produit de l'oxyde nitreux (N₂O) et du peroxyde d'azote (N₂O₄), à partir desquels se forment d'importantes quantités de nitrates dans l'atmosphère. Les oxydes d'azote se transforment ensuite spontanément en anhydride nitrique qui, en se combinant avec l'ammoniac (NH₃) présent dans l'air, engendre du nitrate d'ammonium (NH₄NO₃). Ce NH₄NO₃ contribue également fortement à l'augmentation de la pollution particulaire par le fait qu'il est un des principaux composés chimiques retrouvés au sein des particules. L'acide nitrique, produit en excès, est entraîné par les précipitations, contribuant ainsi au phénomène des pluies acides, pour ensuite se diffuser et s'infiltrer dans les sols atteignant les eaux souterraines ou superficielles, modifiant le pH des milieux naturels et perturbant les écosystèmes.

 \blacktriangleright Les sulfates (SO₄²⁻)

Les sulfates (SO₄²⁻) sont des anions qui constituent la forme biogéochimique du soufre la plus répandue dans les écosystèmes et se forment en permanence dans l'atmosphère par oxydation de dérivés du soufre. Tout comme les nitrates, ils réagissent ensuite avec l'ammoniac et divers cations métalliques présents dans l'air et participent au phénomène des pluies acides.

6- Évaluation de la pollution atmosphérique

L'évaluation de la pollution atmosphérique s'effectue par la mesure de certains polluants, dont les effets sanitaires sont connus, et mesurables. Ces polluants sont appelés indicateurs de pollution. Les principaux indicateurs de pollution sont l'O₃, le NO₂, le SO₂ et les PM. Ces indicateurs font l'objet d'une réglementation européenne (la directive 2008/50/CE) dans laquelle sont définies des normes telles que les valeurs limites d'exposition à ne pas dépasser afin « d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine et/ou l'environnement dans son ensemble ». Ces valeurs limites sont dérivées des valeurs guides de qualité d'air ambiant de l'OMS qui se fonde sur l'analyse d'études épidémiologiques et toxicologiques. Les premières lignes directrices de l'OMS ont été établies en 1987 et la dernière révision date de 2016²⁴. L'OMS y indique des valeurs guides pour aider les pays à établir des normes en prenant en compte les contraintes, les possibilités et les priorités de santé publique (Tableau 4).
Polluant	Valeurs guides de l'OMS		
PM ₁₀	20 μg/m ³ moyenne annuelle 50 μg/m ³ moyenne sur 24		
PM _{2,5}	10 µg/m³ moyenne annuelle	25 µg/m³ moyenne sur 24h	
O ₃	100 µg/m³ moyenne sur 8h		
NO ₂	40 μg/m³ moyenne annuelle	200 µg/m³ moyenne horaire	
SO ₂	20 µg/m³ moyenne annuelle	500 µg/m³ moyenne sur 10 min	

Tableau 4 : Valeurs guides de l'OMS¹³.

De nouvelles mises à jour de ces valeurs guides sont attendues suite à la consultation en 2015 d'un groupe d'experts internationaux, avec en particulier une priorisation de polluants à réévaluer (Tableau 5)²⁴.

Données récentes justifiant une ré- évaluation (Groupe 1)	Données récentes justifiant une ré- évaluation (Groupe 2)	Données récentes justifiant une ré- évaluation (Groupe 3)	Données récentes ne justifiant pas d'un besoin de ré-évaluation (Groupe 4)
Particules	Cadmium	Arsenic	Mercure
Ozone	Chrome	Manganèse	Amiante
Dioxyde d'azote	Plomb	Platine	Formaldéhyde
Dioxyde de soufre	Benzène	Vanadium	Styrène
Monoxyde de carbone	PCDD et PCDF	Butadiène	Tétrachloroéthylène
	HAPs	Trichloroéthylène	Disulfure de carbone
		Acrylonitrile	Fluorure
		Sulfure d'hydrogène	PCBs
		Chlorure de vinyle	1,2-dichloroéthane
		Toluène	Dichlorométhane
		Nickel	

Tableau 5 : Résumé des conseils d'experts en matière de polluants²⁴.

Les particules atmosphériques, traitées dans les chapitres suivants, ont été inclues dans le groupe 1 qui concerne les polluants jugés comme étant prioritaires par les experts pour une ré-évaluation de leurs valeurs guides.

II- Pollution particulaire

1- Définition

La pollution atmosphérique étant devenue une préoccupation majeure au niveau mondial durant ces dernières décennies, la pollution particulaire tient le rôle principal au sein de cette problématique. Cette pollution particulaire est définie, par l'OMS et l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US Environnemental Protection Agency, « US-EPA »), comme « un mélange de particules solides microscopiques et de gouttelettes liquides en suspension dans l'air ». Le terme pollution particulaire regroupe différentes appellations. On parle de pollution particulaire pour les aérosols qui regroupent les fumées noires, les poussières, les brouillards ou bien encore des particules en suspension d'origines diverses renfermant des composés chimiques et/ou biogéniques. Le terme aérosol est défini comme une suspension de particules solides ou liquides dans un gaz, provenant de sources anthropiques ou naturelles, directes ou indirectes. Du fait de leur très faible sédimentation gravitationnelle liée à leur faible masse, les particules atmosphériques peuvent être transportées sur plusieurs milliers de kilomètres selon leur taille et leur comportement aérodynamique et demeurer longtemps en suspension dans l'atmosphère²⁵. Les différentes sources d'émissions, les conditions météorologiques (vent, pluie, température, pression atmosphérique) ainsi que la topographie environnementale provoquent l'accumulation de particules à différents endroits spécifiques de l'atmosphère en fonction de leur taille et de leur composition physico-chimique. Les particules sont généralement classées en fonction de leur taille, un des paramètres déterminant l'impact qu'elles peuvent avoir sur la santé. Dans le domaine scientifique, on parle plus communément de diamètre aérodynamique, tel que défini dans le paragraphe 3.

2- Cycle de vie de la matière particulaire

Les particules atmosphériques peuvent être réparties en deux catégories : les particules primaires et les particules secondaires (Figure 4).



Figure 4 : Classes d'aérosols selon leur mode de formation et leur taille²⁶.

Les particules primaires sont des particules émises directement dans l'atmosphère. Elles peuvent provenir de sources naturelles, issues de l'érosion éolienne, d'éruptions volcaniques, de débris d'origine végétale issus de feux de forêt, des embruns marins ou bien de sources anthropiques, que produisent principalement l'industrie, le transport routier, aérien et maritime, les combustions de combustibles fossiles et les incinérations d'ordures ménagères. Contrairement aux particules primaires, les particules secondaires sont issues de réactions physico-chimiques, majoritairement à partir des processus de conversion gaz-particules, à partir d'autres polluants primaires appelés précurseurs. Les gaz précurseurs des particules secondaires sont essentiellement le SO₂, les NOx, le NH₃ et les COVs. Du fait de la diversité de ces précurseurs, les particules atmosphériques constituent un ensemble très hétérogène de par leurs caractéristiques physico-chimiques et/ou biologiques différentes selon leurs

sources d'émission (particules primaires) et leur processus de formation dans l'atmosphère (particules secondaires). Les particules atmosphériques peuvent être caractérisées selon leur taille, concentration en masse, concentration en nombre ou composition chimique spécifique. La description la plus fréquente et celle utilisée par la législation européenne pour déterminer les valeurs limites d'exposition et d'émission correspond à la concentration massique (en μ g/m³). Ces particules se forment dans l'atmosphère à différentes échelles granulométriques (Figure 4), et suivant des mécanismes plus ou moins complexes.

Les processus de formation des matières particulaires se résument généralement à trois mécanismes de transfert de masse entre la phase gazeuse et la phase particulaire que sont la nucléation, la coagulation et la condensation²⁷.

Un pourcentage non négligeable de particules atmosphériques est formé par nucléation homogène à partir d'une phase gazeuse. La nucléation est le mécanisme de base de la formation des nouvelles particules dans l'atmosphère. Les particules formées ont un diamètre aérodynamique compris entre 1 et 2 nm. Le phénomène de nucléation est souvent basé sur la combinaison d'une molécule d'acide sulfurique (H₂SO₄) et d'une molécule organique. En effet, sous l'action de la lumière du soleil, le SO₂ se transforme en H₂SO₄.

La formation de particules par condensation est un processus par lequel des molécules gazeuses se condensent sur les particules. Ce mécanisme augmente le diamètre des particules tout en conservant leur nombre.

Les particules peuvent également se former par coagulation, processus qui augmente le diamètre des particules primaires en diminuant leur nombre. Il s'agit ici de la formation d'une particule à partir de la combinaison de deux ou plusieurs particules élémentaires (Figure 5).



Figure 5 : Principaux processus de formation des particules²⁸.

Une fois formée, les particules atmosphériques ont une durée de vie plus ou moins longue selon leur composition chimique et leur taille. Leur durée de séjour dans l'atmosphère est également grandement influencée par les différents paramètres météorologiques avec lesquels elles peuvent être mises en contact comme par exemple le vent, l'humidité ou bien encore les diverses précipitations. L'élimination de ces particules ou plutôt la diminution du nombre de particules atmosphériques, peu importe leur taille, se fait par différents mécanismes que l'on appelle dépôts secs ou dépôts humides (Figure 3). Il existe deux types de dépôt sec. Tout d'abord, le processus de diffusion permet l'élimination des aérosols de petite taille (<10 nm). C'est un phénomène de transport de matière irréversible qui tend à uniformiser la distribution particulaire dans l'atmosphère en s'effectuant dans le sens des concentrations décroissantes. Cette diffusion est responsable du temps de résidence atmosphérique court des nanoparticules, de quelques minutes à quelques jours. Le deuxième mécanisme de dépôt sec est le processus de sédimentation sous l'effet de la gravité terrestre, qui constitue le mode d'élimination majeur des grosses particules (>1µm). Ces particules grossières ont également un temps de résidence atmosphérique court, de l'ordre de quelques minutes à quelques jours. Les particules fines qui ne sont éliminées efficacement ni par sédimentation, ni par diffusion tendent à demeurer plus longtemps dans l'atmosphère (de quelques jours à quelques semaines) et sont éliminées par le mécanisme du dépôt humide. Il correspond aux dépôts par précipitation sous forme de pluies, brouillard ou neige²⁹. On distingue deux phénomènes appelés « rain-out » et « wash-out ». Le rain-out est le piégeage des particules pendant la précipitation alors que le wash-out ou le lessivage correspond à la capture des particules par les gouttelettes des nuages en cours de croissance.

Les particules évoluent donc tout au long de leur durée de vie, par le biais de réactions chimiques et physiques (nucléation, condensation, coagulation) avant d'être éliminées de l'atmosphère en retombant au sol par voie sèche ou humide³⁰.

3- Taille des particules atmosphériques

La taille des particules, comme leur origine et leur composition physico-chimique, conditionnent leurs impacts sanitaires. Au sein d'un aérosol, la granulométrie des différentes particules est très hétérogène. Les particules atmosphériques sont donc discriminées les unes par rapport aux autres principalement par leur diamètre aérodynamique qui varie approximativement entre 0,001 et 100 µm. Les particules atmosphériques étant de formes et de densités variables, il est difficile de leur attribuer un diamètre géométrique fixe. Pour pallier ce problème, le concept de « diamètre aérodynamique » a été défini comme le diamètre d'une sphère à la densité normalisée de 1 g/cm³ et qui a la même vitesse de chute dans l'air immobile ou fluide que les particules dont on ne connaît pas précisément la forme. C'est ce diamètre aérodynamique des particules qui détermine leur transport dans l'air, leur élimination de

l'atmosphère et leur déposition dans les voies respiratoires. Ainsi, les particules en suspension sont regroupées en plusieurs classes dont les plus connues sont : les particules totales en suspension (Total Suspended Particles, TSP), les PM₁₀, les PM_{2.5}, les PM₁ et les PM_{0.1}³¹.

Les TSP regroupent les particules totales en suspension dont la taille peut atteindre quelques dizaines de micromètres³².

Les PM₁₀ sont les particules ayant un diamètre aérodynamique théorique inférieur ou égal à 10 µm. Dans les études toxicologiques, elles sont appelées « particules grossières »³³ et sont connues pour leurs propriétés cytotoxiques et pro-inflammatoires^{34,35}. Elles sont le plus souvent issues de processus mécaniques (remises en suspension, érosions) et leur composition est en général proche de celle du matériau d'origine.

Les PM_{2.5} ou encore appelés « particules fines » sont des particules ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm et sont majoritairement formées à partir de la conversion des gaz et de particules en « particules secondaires ». Elles proviennent aussi de la condensation des particules primaires avec des gaz précurseurs (SO₂, NOx) et de la coagulation des particules primaires issues des combustibles fossiles. Cette fraction fine des particules possède une capacité élevée d'adsorption de composés chimiques et biogéniques tels que des COVs, des HAPs, des microorganismes mais également des métaux tels que l'As, le Pb, le Zn, le Cd, le Ni ou le Cr^{36–38}. Elles ont également la propriété de pénétrer dans l'appareil respiratoire inférieur³⁹, ce qui les associe souvent à diverses pathologies respiratoires et cardiovasculaires^{35,40,41}. Les particules fines influent considérablement sur l'environnement par le fait qu'elles peuvent rester dans l'atmosphère pendant plusieurs semaines et être transportées à des centaines de kilomètres par les différentes précipitations et vents atmosphériques.

Les PM_{0.1} sont les particules également appelées « particules ultrafines » ou encore « nanoparticules » et dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 0,1 µm. Ces « nanoparticules » représentent une faible masse au regard des autres particules atmosphériques mais un nombre élevé, soit 70 à 80% des PM totales. Elles résultent notamment de processus de nucléation (formation de particules solides ou liquides à partir de précurseurs gazeux, en phase homogène ou hétérogène). Leur durée de vie est brève car elles disparaissent en grossissant par coagulation entre elles ou avec des particules plus grosses (Figure 6).



Figure 6 : Distribution de taille de particules normalisée de l'aérosol typique de la chaussée⁴².

Grâce à leur très petite taille, elles possèdent des propriétés de pénétration intracellulaire bien spécifique et peuvent se déposer au sein des voies respiratoires distales⁴³. Étant donné que ce sont les plus petites particules qui vont pénétrer le plus profondément dans les voies respiratoires, il est donc important de tenir compte de la masse mais également du nombre de particules lorsque l'on caractérise un aérosol.

La morphologie des particules est très variable, pouvant aller de particules sphériques agglomérées (cas des particules Diesel ou de combustion) à des formes cristallines organisées (cas des aérosols issus d'embruns marins). Si la taille et la composition chimique des particules sont souvent considérées comme les caractéristiques les plus importantes, il convient de noter que leur surface spécifique, voire leur morphologie et leur état de surface, peuvent également jouer un rôle dans leurs propriétés toxicologiques ou écotoxicologiques.

4- Composition chimique des particules

Comme nous l'avons décrit précédemment, les particules atmosphériques présentent une grande hétérogénéité et sont en perpétuelle évolution. Les particules peuvent être composées d'une fraction organique et/ou inorganique, dont les proportions dépendent de leur source d'émission ainsi que de leur contact atmosphérique.

On trouve dans les particules des éléments et des composés minéraux, ainsi que des composés organiques et biologiques, dont les principales composantes sont habituellement :

1) du sulfate d'ammonium et du nitrate d'ammonium formés dans l'atmosphère à partir de l'ammoniac et des acides sulfurique et nitrique produits par oxydation des oxydes de soufre et d'azote.

2) du carbone élémentaire (EC), encore appelé carbone suie ou Black Carbon qui existe sous deux formes cristallines, le diamant et le graphite. Le carbone élémentaire est constitué à quasiment 100% d'atomes de carbone et est chimiquement inerte. Les particules de EC sont émises directement dans l'atmosphère au cours des processus de combustion de matière organique et notamment lors du trafic routier et de feux de forêt, émettant des cendres volantes ainsi que des particules de suies Le graphite peut être présent dans les résidus de combustion en mélange pauvre. Il est susceptible d'adsorber du carbone organique imbrulé au cours de la phase de refroidissement de la combustion, c'est un processus bien connu par exemple dans le cas des particules émises par les moteurs Diesel ou lors de la combustion du charbon ou du bois. Des microparticules de EC sont également émises lors de l'abrasion des pneus, le graphite étant un composé majeur dans les caoutchoucs employés.

3) du carbone organique (OC), fraction regroupant tous les composés organiques fonctionnalisés issus notamment de combustions incomplètes (moteurs et foyers fixes de combustion, feux de biomasse), soit émis directement dans l'atmosphère, soit formés *in-situ* par condensation ou nucléation des produits de dégradation photochimique des COVs primaires d'origine naturelle (terpènes) ou anthropique (échappement des véhicules automobiles, foyers de combustion). La fraction OC est une matrice complexe, constituée d'une multitude de composés appartenant aux familles des alcanes, des acides carboxyliques, des alcools, des aldéhydes, des cétones, des esters, des HAPs, des dioxines...

4) des composés minéraux et des sels (silicates d'aluminium, carbonate de calcium, chlorure de sodium) issus de phénomènes d'abrasion et d'envols de poussières (chantiers, gravières, travail des sols en agriculture, érosion des routes et des sols, poussières désertiques, embruns).

5) des métaux provenant de processus d'abrasion (envolées de poussières, freinage des véhicules), d'émissions liées à des processus industriels (métallurgie) et aux combustions (chauffages, incinérations).

6) des composés d'origine biogène comme les pollens, les spores et divers microorganismes (virus, bactéries, champignons), constituant en général de grosses particules. La majeure partie de la masse des PM₁₀ et PM_{2,5} est constituée de nitrates, sulfates, ammonium, sel marin, carbone et matière organique, dans des proportions qui sont toutefois variables. La fraction minérale peut représenter de 40 à 70 % de la masse des particules et constitue généralement la fraction dominante. Dans l'atmosphère, ces composés chimiques peuvent former des particules différentes ou être associés sur une même particule, à la suite de la condensation d'un gaz sur une particule déjà existante (nucléation hétérogène). Ainsi, souvent les particules sont constituées d'un noyau central de carbone élémentaire entouré d'une couche de surface comportant des composés minéraux et des composés organiques (Figure 7)



Figure 7 : Structure hypothétique d'une particule d'aérosol⁴⁴.

Par exemple, lors d'échantillonnage d'aérosols à l'intérieur de cheminées d'une usine de fabrication d'alliages de ferromanganèse (FeMn) à Dunkerque, l'analyse individuelle des particules collectées a montré une forte proportion de particules de support métallique (Mn⁻/Fe⁻) constituées essentiellement d'aluminosilicate mixte issus des minerais originaux et de composés métalliques (Fe, AL, Si). Après analyse des particules collectées dans l'environnement proche de l'usine, il a été observé que ces particules ont évolué rapidement (en quelques minutes) après émission par adsorption de gaz COVs et d'acide sulfurique émis par la végétation alentour mais aussi par l'agglomération avec des particules préexistantes⁴⁵.

Dans une autre étude, la composition de particules issues de la combustion de Diesel et de bioDiesel a également été déterminée et il a été observé que ces deux types de particules avaient une composition bien différente, essentiellement par rapport aux HAPs et aux métaux⁴⁶. En effet, des moyennes de concentrations plus élevées en carbone élémentaire et organique ainsi que des forts taux de Cu et Mo ont été mesurés dans les particules de bioDiesel alors que les particules issues de Diesel contenaient des concentrations significativement plus élevées de Pb. Il a également été observé que la concentration totale

de HAPs libérés pendant l'utilisation du carburant Diesel était 1,9 fois supérieure à celle du bioDiesel.

D'autres études ont également étudié la composition de particules issues de moteur Diesel et ont observé une composition différente de l'étude précédente. Les particules étaient composées de 41% de carburant imbrulé, de 25% d'huiles imbrulées, de 14% de mélanges de sulfates et d'eau, de 13% de cendres et de 7% de carbone, formant le noyau carboné autour duquel se forme la particule⁴⁷.

Connaître la composition chimique des particules atmosphériques permet donc d'étudier les sources en un lieu donné et parallèlement de rechercher les raisons de la toxicité éventuellement engendrée par celles-ci. Certaines sources sont bien caractérisées telles que les poussières désertiques ou bien les particules de moteur Diesel et dans une moindre mesure les particules de tir, alors que d'autres le sont beaucoup moins telles que les particules de fumigènes.

5- Méthodes de mesure de la pollution particulaire

Les méthodes de mesure des particules en suspension sont multiples et variées, en raison de leur nature extrêmement complexe et diversifiée. En effet, la description complète de la pollution particulaire nécessite la mise en œuvre de différentes méthodes basées sur trois approches⁴⁸ : la détermination de la concentration massique exprimée en microgrammes par mètre cube d'air, la détermination du nombre de particules et enfin l'analyse de leur composition chimique. Le comptage permet de quantifier les particules très fines. Les aérosols ayant également une composition très variée, dont dépendent leurs effets sur la santé, la détermination de la composition chimique des particules permet d'améliorer les connaissances sur leur origine et leurs mécanismes de formation⁴⁹. La plupart de ces méthodes sont toutefois coûteuses, assez lourdes à mettre en œuvre et donc difficilement applicables en routine au sein des réseaux de surveillance de la qualité de l'air.

La caractérisation des particules en suspension comporte toujours une phase de prélèvement, suivie d'une phase de mesure ou d'analyse. Les particules en suspension peuvent être prélevées soit par aspiration d'un volume d'air au moyen d'une pompe, soit par dépôt passif. Dans ce cas, l'échantillonnage des particules se fait par dépôt naturel (dépôt sec par gravité ou dépôt humide par les précipitations) sur un support de collecte. Les supports les plus utilisés (normés) sont les plaquettes de dépôt et les collecteurs de précipitations (jauges Owen), utilisés notamment pour les prélèvements de métaux ou de dioxines. Mais il est possible d'utiliser d'autres dispositifs, tels que des plaques de verre. Cette méthode nécessite des temps d'échantillonnage très longs pour recueillir suffisamment de matière, de 1 à 2 mois. De plus, l'échantillon sera constitué de particules de diamètres variables, avec une proportion

importante de « grosses » particules, présentant un risque toxicologique par inhalation faible. Il n'existe aucune relation de transfert entre la concentration par unité de surface et la concentration dans l'air.

Dans le cas d'un prélèvement par aspiration, on peut distinguer les prélèvements sans coupure ou avec coupure granulométrique. Ces derniers sont effectués à l'aide d'une « tête » de prélèvement qui, par sa conception, ne capte en théorie que des particules de diamètre aérodynamique inférieur à une valeur définie. Il existe également les prélèvements avec fractionnement granulométrique réalisables à l'aide d'impacteurs en cascade permettant d'étudier la distribution granulométrique. Un impacteur en cascade est constitué d'une succession d'étages dits d'impaction, comportant chacun un ajustage dirigeant un jet d'air à haute vitesse contre une surface solide. Les particules supérieures à un diamètre donné ont une inertie telle qu'elles vont s'impacter sur cet obstacle, perpendiculaire au jet, sur lequel est posé un filtre. Les particules les plus fines sont entraînées vers l'étage suivant par le flux d'air qui contourne l'obstacle. On récupère ainsi à chaque étage des particules de plus en plus fines. L'étude de la distribution granulométrique des aérosols peut également se faire à l'aide d'appareils utilisant les propriétés physiques, notamment électriques.

L'échantillonnage sera suivi d'une phase de mesure ou d'analyse, permettant de déterminer la masse ou du nombre de particules, d'effectuer une caractérisation chimique portant sur un ou plusieurs composés⁴⁹.

III- Impact sanitaire de la pollution particulaire

1- L'appareil respiratoire : voie d'accès principale

a. Fonction et structure (Généralités)

La pollution particulaire provoque d'importants effets sanitaires chez l'homme, voire même de nombreux décès prématurés, ce qui mobilise fortement le monde de la recherche scientifique depuis plus d'une cinquantaine d'année.

Les polluants atmosphériques sont en contact direct avec l'appareil respiratoire de l'homme avec une moyenne de 15 m³ d'air respiré par jour ainsi qu'une surface d'échanges gazeux pouvant atteindre les 100 m^{2 50}. Le poumon constitue ainsi l'interface la plus importante entre le milieu extérieur et l'organisme, ce qui, par son rôle dans l'oxygénation des différents tissus, lui confère un intérêt particulier en toxicologie. Il est une cible privilégiée pour les différents agents toxiques et polluants susceptibles de se trouver dans l'air que nous respirons comme des microorganismes mais aussi des composés gazeux et particulaires.

L'appareil respiratoire est un organe complexe dont la principale fonction est d'assurer l'échange d'O₂ et de CO₂, au niveau des alvéoles pulmonaires, entre l'air et le sang afin d'approvisionner les différents organes du corps humain en oxygène. Il est constitué de trois régions fonctionnelles distinctes que sont les voies respiratoires supérieures, les voies respiratoires inférieures et les voies respiratoires distales.

Les voies respiratoires supérieures sont constituées par les voies de conduction, localisées dans la région extra-pulmonaire. Elles comprennent les fosses nasales, le larynx, le pharynx ainsi que la trachée. Les fosses nasales ont pour rôle de percevoir les odeurs par l'intermédiaire d'un épithélium olfactif et sont associées à un épithélium respiratoire, cylindrique, cilié, pseudo stratifié dont la fonction est de réchauffer, humidifier et filtrer l'air inspiré grâce à un réseau très dense de capillaires sanguins. En dessous des fosses nasales se trouve le pharynx, carrefour entre les voies respiratoires et le tube digestif, suivi du larynx où se situe l'épiglotte ainsi que les cordes vocales. Faisant suite au larynx, se trouve la trachée, tube flexible composé d'anneaux cartilagineux incomplets et qui permet d'amener l'air riche en oxygène aux poumons et de rejeter l'air saturé en CO₂. La trachée est composée d'un épithélium de type respiratoire renfermant de très nombreuses cellules caliciformes. Sa surface est humidifiée par des sécrétions muqueuses et séreuses qui contiennent des anticorps de type IgA, intervenant comme agent protecteur contre les infections. Les battements ciliaires font remonter le film muqueux vers le larynx englobant des particules étrangères contenues dans l'air inspiré qui n'auraient pas été retenues en amont²⁷.

Les voies respiratoires inférieures comprennent les voies de conductions de l'air situées dans la région intra-pulmonaire que sont les bronches. Les parois de ces dernières contiennent du cartilage et des glandes séromuqueuses. L'arbre trachéobronchique est composé d'un épithélium de revêtement mucociliaire pseudostratifié constitué de trois types de cellules : les cellules sécrétrices qui regroupent les cellules à mucus et les glandes séreuses, les cellules ciliées et les cellules basales. Cet épithélium participe à la fonction de clairance au niveau des voies respiratoires, processus physiologique majeur dans la protection des poumons contre les agressions extérieures. Le mucus sécrété par l'épithélium trachéobronchique est composé de deux phases ; une couche superficielle épaisse, de viscosité élevée et une couche sousjacente, le liquide périciliaire dont la fluidité permet le battement ciliaire et le déplacement du mucus sécrété dans le sens rétrograde afin d'assurer la remontée des particules déposées dans les voies aériennes et leur élimination. L'épithélium bronchique est également capable de produire de nombreux médiateurs comme des dérivés lipidiques, des facteurs de croissance, des peptides broncho-constricteurs ou encore une grande diversité de cytokines et de chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire⁵¹.

Les voies respiratoires distales sont composées essentiellement des bronchioles et des alvéoles pulmonaires. L'épithélium bronchique est un épithélium monostratifié composé de trois types cellulaires différents : les cellules ciliées, neuroendocriniennes et de Clara. Cet épithélium bronchique ayant également la fonction de sécrétion de mucus, joue un rôle important dans l'ouverture des alvéoles pulmonaires par l'intermédiaire d'une baisse de tension due à la production de surfactant en plus d'assurer un rôle de protection mécanique vis-à-vis du milieu extérieur grâce à la cohésion des cellules entre elles⁵². L'épithélium alvéolaire, quant à lui, est également monostratifié mais est composé de seulement deux types cellulaires, les pneumocytes de type I et de type de II (présents en nombre équivalent mais avec une majorité de surface de plus de 90% des pneumocytes de type I) qui, à eux deux, constituent une mince barrière à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air⁵³.

L'appareil respiratoire est caractérisé par une hétérogénéité cellulaire qui se traduit par la présence d'une quarantaine de types cellulaires. Les différentes caractéristiques de ces cellules fournissent aux épithéliums bronchiques et alvéolaires leurs fonctionnalités complexes. Il en résulte un système de défense particulièrement efficace ; d'une part grâce aux caractéristiques anatomiques très spécifiques des voies respiratoires et d'autre part grâce à son système de défense intrinsèque sécrétant de nombreuses molécules⁵⁴. En effet, en plus de son action de barrière physique, l'épithélium bronchique joue un rôle crucial dans la réponse à l'exposition aux particules en déclenchant et en augmentant les mécanismes de défense pulmonaire au travers de la synthèse et la libération de divers médiateurs pouvant induire la différentiation, le chimiotactisme, et l'activation inflammatoire de cellules⁵⁵.

b. Mécanismes de dépôt particulaire au sein de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire constitue la voie majeure de pénétration des particules atmosphériques dans l'organisme et leur pénétration est d'autant plus importante lorsque l'individu pratique une activité physique ou présente des fonctions pulmonaires altérées. Les particules, une fois inhalées, peuvent soit être rejetées via différents mécanismes de défense, soit se déposer dans les différentes régions de l'arbre respiratoire. Ce dépôt n'est généralement pas uniforme dans l'ensemble des voies respiratoires. En effet, le profil granulométrique des particules, leurs degrés d'agrégation et d'agglomération ainsi que la géométrie des voies respiratoires conditionnent étroitement le degré de pénétration, de rétention et d'élimination des particules³¹. Le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire s'effectue selon cinq principaux mécanismes⁵⁶ (Figure 8).

Tout d'abord, les particules peuvent se déposer au sein des différentes voies de conduction par impaction. Les particules en suspension ont tendance à suivre leur trajectoire initiale. Toutefois, lorsqu'elles atteignent une courbe dans les voies aériennes, du fait de leur inertie, de nombreuses particules ne peuvent suivre le changement de direction de l'air et s'impactent sur les parois au niveau des bifurcations. La probabilité d'impaction dépend de la vitesse de l'air et de la masse de la particule.

La sédimentation représente le deuxième mécanisme de dépôt. L'attraction gravitationnelle et la résistance de l'air finissent par annuler la flottabilité des particules ce qui entraîne leur dépôt sur la muqueuse pulmonaire. Ce type de dépôt s'effectue essentiellement dans les bronches et bronchioles où la vitesse de passage de l'air est faible.

Le mécanisme d'interception consiste au piégeage des particules ne suivant pas l'écoulement d'air ou étant trop grosses au niveau des points de jonction de l'arbre bronchique. Ce type de dépôt concerne essentiellement les fibres comme par exemple l'amiante.

La diffusion brownienne est le dépôt de particules fines sur la paroi des voies respiratoires après collision aléatoire ou freinage contre d'autres molécules présentes dans l'air. La diffusion est le mécanisme de dépôt le plus important dans les voies aériennes distales au niveau des alvéoles pulmonaires.

Le dernier mécanisme est le dépôt par interaction électrostatique. Ce mécanisme concerne exclusivement les particules fortement chargées, qui vont se déposer sur les parois inversement chargées.

Il n'est pas exclu que d'autres voies de pénétration peuvent exister comme par passage transcutané ou encore par ingestion³¹.



Figure 8 : Mécanismes de dépôt des particules dans les voies respiratoires⁵⁷.

Le mécanisme de dépôt des particules va dépendre des propriétés physico-chimiques : taille, forme, densité, charge et hygroscopie.

Les grosses particules de taille supérieure aux PM_{10} et les particules grossières (ayant un diamètre aérodynamique se situant entre 10 et 2,5 µm) sont capables de pénétrer dans les voies respiratoires supérieures lors de l'inhalation et sont donc captées au niveau du segment naso-pharyngien et au niveau de la trachée par impaction et sédimentation, pour ensuite être évacuées par mouchage ou déglutition. Les particules les plus petites de cette classe granulométrique (4 - 2,5 µm) ont également une efficacité de pénétration dans le compartiment alvéolaire de 50 % permettant à cette petite fraction de particules grossières d'atteindre le poumon profond.

Les PM_{2.5} peuvent se déposer dans les voies aériennes inférieures au niveau des bronches, par impaction, sédimentation et interactions électrostatiques. Ces particules sont captées par le mucus produit par les cellules ciliées et les cellules caliciformes de l'épithélium bronchique. Dans un mouvement ondulatoire, les poils des cellules ciliées transportent le film muqueux et les corps étrangers qui y sont englués jusqu'au pharynx où ils sont déglutis en continu et éliminés par le système gastro-intestinal.

Les PM_{0.1} sont capables d'atteindre les voies respiratoires distales, bronchioles et alvéoles pulmonaires, essentiellement par le mécanisme de diffusion brownienne. Du fait de leur très petite taille et de leur grande aire de surface, elles peuvent se dissoudre rapidement au sein de l'épithélium respiratoire et sont donc en mesure de traverser la paroi alvéolaire, se

transloquer dans la circulation sanguine afin d'atteindre rapidement d'autres organes (comme par exemple le cœur, le foie, la rate ou même le cerveau) pour y exercer leur toxicité²⁷. Ces particules peuvent également être phagocytées par les macrophages alvéolaires et transportées hors du poumon par l'intermédiaire de l'appareil mucociliaire⁵². Ce mécanisme de clairance ou nettoyage s'effectue généralement en deux ou trois jours ce qui implique une exposition hypothétique des voies respiratoires de quelques jours. Cette exposition peut se répercuter par une toxicité envers les cellules épithéliales et endothéliales ainsi que sur les fibroblastes et les macrophages alvéolaires. Cette exposition est généralement prolongée en ce qui concerne les particules ultrafines du fait de leur difficulté à être phagocytées par les macrophages alvéolaires (contrairement aux particules fines), ce qui conduirait à leur persistance accrue au sein des alvéoles pulmonaires (quelques dizaines de jours)⁵⁸.

La norme européenne EN 481 définit également trois fractions d'aérosols dans le cadre de la problématique santé-travail, que sont la fraction inhalable, thoracique et alvéolaire.

La faction inhalable correspond à la probabilité moyenne de pénétration des particules en suspension dans l'air dans les voies respiratoires à travers le nez et la bouche pendant l'inhalation, soit les particules comprises entre 100 et 10 µm.

La fraction thoracique correspond à la probabilité moyenne de pénétration des particules inhalés au-delà du larynx, c'est-à-dire dans les voies trachéo-bronchiques et dans le poumon profond, soit les particules comprises entre 10 et 4 µm.

La fraction alvéolaire correspond à la probabilité moyenne de pénétration des particules inhalés dans les voies aériennes non ciliées (bronchioles terminales et alvéoles pulmonaires), soit les particules de taille inférieure à 4 µm.

Il est intéressant de noter que Carvalho et son équipe a également constaté que, lorsque la taille des particules diminue aux dimensions submicroniques, le dépôt total dans le poumon diminue également. Avec une diminution supplémentaire de la taille des particules dans l'échelle nanométrique, le dépôt total dans le poumon augmente de nouveau à des niveaux équivalents ou supérieurs aux particules micronisées. Ce minimum de dépôt pulmonaire total pourrait être attribué à la prédominance du mécanisme de diffusion par rapport aux mécanismes d'impaction / sédimentation en fonction de la taille des particules (Figure 9)⁵⁹.



Figure 9 : *Dépôt respiratoire en fonction du diamètre particulaire.* Alv : région alvéolaire ; TB : région trachéo-bronchique⁵⁹.

Ces observations ont également été confirmées l'équipe de Sturm. En effet, lorsque la taille des particules se situe dans l'échelle nanométrique, le dépôt total augmente à un niveau équivalent voire supérieur à celui trouvé pour les particules de taille micrométrique⁵⁶. Dans la figure 10 ci-dessous, on peut en effet observer lors d'une approche par modélisation, la localisation de dépôt des particules en fonctions de leur diamètre nanométrique. Les particules les plus fines de 1 nm ont tendance à se déposer majoritairement au niveau de l'arbre trachéobronchique contrairement aux particules plus grosses, de 10 à 100 nm, qui se déposent plus profondément dans la totalité de l'arbre respiratoire jusque dans les alvéoles pulmonaires (Figure 10).



Figure 10 : Plan de dépôt planaire médian de trois nanoparticules différentes. (A) particules de 1 nm ; (B) particules de 10 nm ; (C) particules de 100 nm⁵⁶.

2- Effets sanitaires induits par les particules

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques ont vu le jour, ayant pour but de démontrer le lien de causalité entre l'exposition à la pollution particulaire et l'augmentation de la morbi-mortalité d'origine cardio-respiratoire au sein de la population.

Les effets particulaires qui ont été le plus décrits sont ceux des particules fines et ultra-fines⁶⁰. En effet, les matières particulaires sont facilement déposées au niveau des bifurcations et ramifications de l'arbre bronchique en raison de l'écoulement de l'air et des turbulences, augmentant leur interaction avec la muqueuse pulmonaire et produisant des dommages locaux⁶¹.

Particules atmosphériques et pics de pollution

Depuis les années 1900, avec l'ère de l'industrialisation et l'urbanisation, la qualité de l'air a commencé à se dégrader par l'utilisation généralisée du charbon comme source d'énergie dans le secteur industriel et les foyers d'Europe occidentale, des Etats-Unis et d'autres nations introduites dans un « âge des fumées ». Suite à la pollution atmosphérique et aux dommages sur la santé publique qui en découlent, les premières lois de contrôle des émissions de fumées se sont avérées peu nombreuses et inefficaces. Les différentes catastrophes environnementales du milieu du XX^{ème} siècle, telles que le grand « smog » de Londres vont être à l'origine de la prise de conscience, par les autorités et les populations, de l'importance de la pollution sur la santé humaine.

Le premier épisode de pollution atmosphérique qui ait été bien documenté quant à ses causes et conséquences sanitaires a eu lieu dans la vallée de la Meuse en Belgique. Du 1^{er} au 5 Décembre 1930, la combinaison de fortes pressions atmosphériques et d'un léger vent provenant de la ville industrielle de Liège, a entraîné la mise en place d'un épais brouillard de particules dans la vallée. Durant ces 4 jours, de nombreux cas de troubles respiratoires et une mortalité 10 fois supérieure à la normale ont été recensés dans la population. Les investigations menées à la suite de cet incident ont identifié la combustion de charbon des usines de la région comme étant la source principale de la pollution caractérisée essentiellement de SO₂ et d'acide sulfurique dont les concentrations ont respectivement excédé les 100 mg/m³ et 4 mg/m^{3 62}.

Le premier accident mortel lié à la pollution aux États-Unis a eu lieu à Donora (Pennsylvanie) en 1948. Des conditions anticycloniques particulières ont entraîné une inversion des températures contribuant à la formation d'un nuage chargé de particules et d'autres contaminants d'origine industrielle. Durant cet épisode, on estime entre 5000 et 7000 (sur une ville de 14 000 habitants), le nombre de résidents ayant développé une pathologie dont 400 ont nécessité une hospitalisation et 20 sont morts avant la dissipation du nuage⁶³.

A partir de l'évènement du grand « smog » de Londres en décembre 1952, les études et la mise en place de règlementations en termes de pollution de l'air se sont considérablement renforcées. En effet, entre le 5 et 9 décembre 1952 un épais brouillard a recouvert Londres accompagné d'une augmentation soudaine de la mortalité. A cette date, les hautes pressions et l'absence de vent ont empêché la dispersion du nuage et emprisonné les polluants audessus de Londres. Durant le « smog » les taux de fumées et de SO₂ ont atteint des concentrations exceptionnelles, passant de 0,49 mg/m³ à 4,46 mg/m³ pour les fumées et de 0,41 mg/m³ à 3,83 mg/m³ pour le SO₂. Il a été estimé par le ministère de la santé entre 3500 et 4000 le nombre de décès attribuable à cet événement de « smog ».De ces mêmes observations, les experts ont évalué à 59% la part attribuable des maladies respiratoires à l'augmentation de la mortalité et à 22% pour les maladies cardiovasculaires⁶⁴. De plus, une analyse rétrospective a démontré qu'il y aurait eu au moins 12000 décès supplémentaires dus aux effets persistants de l'épisode de « smog » entre décembre 1952 et février 1953 témoignant d'un effet à long terme de la pollution de l'air sur la santé humaine⁶⁵.

Au cours des années 1990, de nombreuses études ont vu le jour aux États-Unis, se rapportant essentiellement aux effets des PM₁₀, qui étaient la référence métrologique de la pollution atmosphérique. Lors d'une étude regroupant les données des admissions hospitalières de Chicago entre 1988 et 1993, il a été observé une augmentation de 1,27% des admissions pour cause de problèmes cardiaques, de 1,45% pour obstruction pulmonaire et de 2% pour pneumonies lors de pics de pollution, correspondant à une augmentation d'au moins 10 µg/m³ de la quantité des PM₁₀ dans l'air⁶⁶. Cette corrélation a été confirmée par de nombreuses études, notamment par l'équipe de Dominici en 2005 qui a également démontré une augmentation de la mortalité de 0,41% dans les hôpitaux de 90 villes des États-Unis suite à un épisode de forte pollution atmosphérique².

Un lien de causalité entre l'exposition à la pollution particulaire et l'augmentation de la morbimortalité d'origine cardio-respiratoire au sein de la population a donc été démontré lors de pics de forte pollution⁶⁷. En effet, l'exposition aux particules atmosphériques a été associée à des hospitalisations pour des pathologies comme l'asthme aigu et l'augmentation de la pression artérielle systolique chez les enfants^{68,69} ainsi qu'à la ré-hospitalisation chez les patients atteints d'infarctus du myocarde⁷⁰. Ces observations ont déclenché des actions législatives qui ont abouti à des réglementations visant à limiter les effets toxiques et parfois mortels des polluants atmosphériques³. Ainsi, dans la plupart des pays industrialisés, les normes de rejet dans l'atmosphère et les changements de sources de chauffages ont permis de réduire considérablement la pollution acido-particulaire.

Particules atmosphériques et cancers

Des études ont démontré le rôle d'une exposition à long terme dans le développement de pathologies chroniques et en particulier le cancer. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé comme cancérogène avéré (groupe I) la pollution aux particules Diesel en 2012 et, en 2013, la pollution atmosphérique⁷¹ et les particules fines. Dans un document publié en 2016 pour la remise à jour des valeurs guides de l'OMS, il est indiqué que les risques estimés de cancers après des expositions aux PM₁₀ peuvent être dus aux composés chimiques présents et en particulier les HAPs. Les risques de développer un cancer lié à l'exposition aux PM_{2.5} sont équivalents à ceux développés par les PM₁₀.

Les particules contiennent deux familles chimiques principales qui permettent l'induction d'un stress oxydant ; les HAPs et les métaux lourds. Plusieurs représentants de ces deux familles sont des agents mutagènes et cancérogènes. Les cancers de la trachée, des bronches et du poumon représentent environ 7% de la mortalité totale attribuable aux PM_{2.5} en 2010 ^{72–75}.

Particules atmosphériques et maladies respiratoires

L'exposition aux particules atmosphériques peut conduire à d'autres pathologies. Ces particules sont capables, une fois introduites dans les poumons, de s'accumuler dans les macrophages alvéolaires et de produire des dommages à l'ensemble de l'appareil respiratoire. Elles peuvent, entre autres, augmenter la perméabilité cellulaire, réduire l'activité mucociliaire, induire une production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et une libération de cytokines. Ces événements peuvent conduire au développement et/ou à l'aggravation de maladies pulmonaires telles que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la fibrose pulmonaire, la bronchiolite, les rhino-pharyngites, l'œdème pulmonaire, l'hypersécrétion bronchique⁷⁶.

La BPCO est une maladie chronique progressive qui se caractérise par une limitation du débit d'air inspiré et expiré⁷⁷. Ce rétrécissement du calibre bronchique peut être provoqué par le dépôt de particules au niveau des bronches favorisant la contraction des muscles lisses et l'inflammation de la muqueuse bronchique des voies respiratoires et du parenchyme pulmonaire, augmentant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-6, IL-1 β , TNF- α et IL-8 (en particulier par les neutrophiles, les macrophages activés et les lymphocytes)^{78,79}. Cette inflammation est généralement accompagnée d'un œdème des parois et d'une surproduction de mucus par les glandes bronchiques. Le rétrécissement progressif entraîne une gêne progressive et croissante à l'expiration, se traduisant par une toux chronique et une rétention d'air dans les alvéoles. Par la suite, celles-ci se distendent, puis se détruisent, laissant place à des espaces aériens non fonctionnels ; c'est ce que l'on appelle l'emphysème. La BPCO est la cinquième cause de mortalité en France et l'OMS estime qu'elle

tue plus de 3 millions de personnes chaque année au niveau mondial. L'équipe de Zhao a estimé les effets à court terme de la pollution particulaire (PM_{2.5}) sur les consultations hospitalières en raison de maladies respiratoires générales, ainsi que la charge de morbidité associée. Les PM_{2.5} et PM₁₀ se sont révélés être significativement associés à la morbidité de la BPCO⁸⁰.

L'asthme est une maladie des voies respiratoires, souvent d'origine allergique, qui se traduit le plus souvent par une hyperréactivité des voies aériennes, une obstruction par l'hypersécrétion de mucus et l'inflammation chronique des bronches au contact de certains facteurs, en général inhalés comme par exemple les particules atmosphériques. La diminution du calibre des bronches provoque une gêne respiratoire importante, surtout à l'expiration, accompagnée généralement d'une toux irritante et d'un sentiment d'anxiété. La fonction des particules comme adjuvant dans l'apparition de novo de l'asthme a été démontrée chez la souris⁸¹. Les particules en suspension induiraient la maturation des lymphocytes B et un stress oxydatif, augmentant la production d'EROs, d'IL-1 et d'IL-8⁸¹. L'asthme est un problème de santé public majeur touchant, selon l'OMS, près de 3,5 millions de personnes en France et 300 millions dans le monde. Lorsqu'il n'est pas traité, l'asthme peut entraîner la mort (2 000 morts/an en France et 250 000 morts/an dans le monde). Plusieurs études précliniques et cliniques ont porté sur les effets respiratoires à court terme de l'inhalation de particules fines⁸⁰. Par exemple, des études ont observé des associations entre particules de moteur Diesel, particulièrement riche en nanoparticules et réduction de la fonction pulmonaire chez les asthmatiques⁸², ainsi qu'une augmentation des indicateurs de l'inflammation chez les adolescents asthmatiques et sains de la ville de New York⁸³.

L'exposition aux particules peut également affecter les poumons en induisant une fibrose importante. La fibrose pulmonaire est une maladie chronique provoquant une inflammation permanente qui a pour conséquence de créer du tissu cicatriciel dans les poumons. Les cellules impliquées dans le processus fribrotique sont les fibroblastes et les macrophages produisant en excès les composants de la matrice extra-cellulaire ainsi que des facteurs impliqués dans le remodelage tel que le TGF- β , qui stimule le dépôt de collagène dans le poumon. Le remplacement du poumon normal par le tissu cicatriciel provoque la diminution irréversible de la capacité de diffusion de l'oxygène au niveau des alvéoles pulmonaires²⁷.

Particules atmosphériques et maladies cardiovasculaires

Les pathologies cardiovasculaires peuvent également être associées à l'exposition aux particules⁸⁴ et les plus fréquentes sont l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), l'hypertension artérielle et l'angine de poitrine⁸⁵. Une exposition à de fortes concentrations de particules fines a été associée à des niveaux élevés de certains

biomarqueurs comme le fibrinogène, les facteurs de prothrombine 1 et 2 et le facteur de von Willebrand^{86,87}. Les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires pré-existantes, les personnes atteintes de diabète^{69,88} et les personnes âgées pourraient être considérées comme plus sensibles en termes de morbidité cardiovasculaire vis-à-vis de pollution de l'air⁸⁹.

La composition chimique des particules ambiantes varie considérablement entre les différentes zones géographiques, aussi est-il difficile d'identifier la composante spécifiquement associée à une toxicité cardiovasculaire. Néanmoins, des études effectuées sur l'animal indiquent que les métaux de transition et la matière carbonée composant les particules induiraient des effets cardiotoxiques⁹⁰. Il a également été démontré que les gaz composants les aérosols ambiants (O₃, SO₂, NO₂ et CO) sont associés à la survenue d'infarctus du myocarde, à l'augmentation de l'ensemble des hospitalisations pour pathologies cardiaques et à l'exacerbation d'angine de poitrine liée à l'exercice chez les patients angineux stables⁸⁴.

L'exposition aux particules participe chez l'homme à l'augmentation de marqueurs inflammatoires (comme le taux circulant de protéine C réactive), à des dysfonctionnements de l'endothélium et à une vasoconstriction aiguë, ce qui conduirait à l'exacerbation de l'ischémie myocardique^{91,92}. En effet, l'augmentation de la concentration de protéine C réactive est un marqueur biologique de l'inflammation systémique et un facteur prédictif de maladie cardiovasculaire⁹³. L'augmentation de la tension artérielle⁹⁴ et la diminution de la capacité des artères à se dilater sont généralement préjudiciables aux différentes fonctions cardiovasculaires. Le dysfonctionnement vasculaire peut être causé par la diminution de médiateurs tels que le NO libéré par l'endothélium vasculaire^{95,96} ou encore par une sensibilité accrue aux facteurs vasoconstricteurs⁹⁷. Les particules ultra-fines tendent à augmenter la coagulation sanguine^{98,99}, favorisant l'activation des plaquettes^{92,100} et réduisant la clairance du caillot sanguin¹⁰¹.

L'inflammation systémique est également un facteur de risque bien connu pour le développement de l'athérosclérose¹⁰². L'équipe de Zanobetti a également corrélé l'augmentation de 10 μ g/m³ de PM_{2.5} à une augmentation de 2,8 mmHg de la pression artérielle systolique et de 2,7 mmHg de la pression artérielle diastolique¹⁰³.

Les particules fines de l'air ambiant inhalé augmentent la production d'EROs dans les voies aériennes et les alvéoles pulmonaires et stimulent la réaction inflammatoire locale dans les poumons. Les cytokines pro-inflammatoires et ROS libérés dans la circulation sanguine affectent le contrôle autonome cardiaque¹⁰⁴ (fréquence cardiaque, variabilité de la fréquence cardiaque et contractilité cardiaque), la pression artérielle, le tonus vasculaire, la coagulation sanguine et la progression de l'athérosclérose. Ces mécanismes physiopathologiques

pulmonaires et cardiaques exacerbent directement l'ischémie myocardique et augmentent la mortalité cardio-vasculaire¹⁰⁵.

Particules atmosphériques et autres effets sanitaires :

Le système cardio-respiratoire n'est pas la seule cible des particules en suspension. Les particules fines et ultrafines ont la capacité de franchir la barrière épithéliale vasculaire afin de s'accumuler dans les autres organes très vascularisés comme par exemple le rein, le foie ou même encore le système nerveux central¹⁰⁶. Les reins sont la cible des métaux lourds, tels que le plomb et le cadmium, adsorbés aux particules qui peuvent, à long terme, entraîner une insuffisance rénale^{107,108}. D'autres effets toxiques des particules touchent également la fertilité. En effet, l'exposition aux particules fines peut affecter l'embryon surtout lors du stade blastocystaire tout en n'interférant pas dans le développement précoce de l'embryon¹⁰⁹.

La rupture des barrières naturelles, y compris les barrières épithéliales nasales, intestinales et pulmonaires, ainsi que la barrière hémato-encéphalique facilite le passage des polluants atmosphériques et plus précisément de la matière particulaire dans l'organisme, et plus particulièrement chez des enfants exposés à de forts taux de pollution en raison de leur fréquence respiratoire plus élevée et de leurs barrières naturelles moins développées. Une neuro-inflammation étendue contribuant à la perte de cellules dans le système nerveux central est probablement un mécanisme crucial par lequel des déficits cognitifs peuvent survenir. D'après Brockmeyer et son équipe, les effets neurocognitifs de la pollution de l'air, bien que subtiles, sont importants dans toutes les populations et potentiellement cliniquement pertinents à mesure que les changements neurodégénératifs évoluent tôt¹¹⁰.

Les particules en suspension représentent donc un facteur de risque majeur en termes de santé à l'échelle mondiale. La corrélation entre l'augmentation de leur concentration atmosphérique et l'émergence de pathologies n'est plus à démontrer. Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques associés à ces différentes pathologies ne sont pas entièrement élucidés et font l'objet d'études par la communauté scientifique.

3- Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité des particules

Les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires des particules font actuellement l'objet de nombreuses recherches qui utilisent pour cela différents modèles cellulaires *in vitro* ainsi que des modèles *in vivo*. Ces approches complémentaires aux études épidémiologiques ont permis d'apporter des éléments de réponses sur les mécanismes physiopathologiques sousjacents. Ainsi, l'évaluation de la toxicité particulaire est passée d'indicateurs sanitaires généraux (mortalité et admissions hospitalières pour causes cardio-respiratoires) à des indicateurs de nature physiopathologique (troubles du rythme cardiaque, augmentation de l'épaisseur de la plaque d'athérome, vasoconstriction, spasme respiratoire, toux d'irritation, etc), puis à des mécanismes biochimiques comme l'augmentation des facteurs sanguins de coagulation (fibrinogène) ou encore de cytokines pro-inflammatoires. Les mécanismes biologiques faisant consensus à l'heure actuelle pour expliquer les associations entre exposition aux polluants atmosphériques et effets cardio-respiratoires sont principalement le stress oxydant et l'inflammation.

a. Stress Oxydant et particules

D'une manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défenses anti-oxydants pouvant conduire à l'altération de certaines fonctions cellulaires. Ce déséquilibre penche généralement en faveur des pro-oxydants et est dû, soit à une défaillance des systèmes de défense, soit à une surproduction d'EROs affectant l'intégrité des cellules. Le terme d'EROs regroupe les radicaux libres de l'oxygène, très réactifs du fait de la présence d'un électron libre au niveau de la couche de valence, tels que l'anion superoxide (O_2^{-}) ou le radical hydroxyle (OH•) mais également les oxydants non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le peroxynitrite (ONOO⁻). Les EROs peuvent s'inter-convertir ou se transformer en molécules inactives par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques, permettant ainsi de protéger la cellule de leurs effets oxydants¹¹¹ (Figure 11).



Figure 11 : Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène¹¹². En conditions physiologiques, les fonctions de prolifération, de différenciation ou bien encore de réponse immunitaire sont possible malgré un faible taux basal d'EROs mais néanmoins nécessaire. En condition de stress oxydant, l'élévation du taux d'EROs au-delà du taux physiologique peut aboutir à une altération des fonctions cellulaires et des macromolécules biologiques (lipides, glucides, protéines et ADN). Ces altérations ont été mises en évidence dans les effets sanitaires induits par la pollution de l'air¹¹³. Les sources endogènes productrices d'EROs impliquées dans l'initiation d'un stress oxydant sont nombreuses et varient selon les tissus. La mitochondrie joue un rôle majeur comme source principale d'EROs par la production d'anions superoxydes au niveau de la chaîne respiratoire, rapidement transformés en H₂O₂¹¹⁴. L'activation des cellules immunitaires lors d'une exposition à des particules représente également une source importante d'EROs induite par un excès de consommation d'O₂ par les macrophages. Cet oxygène sera par la suite transformé enzymatiquement en radicaux libres qui s'attaqueront à l'agent étranger mais également aux tissus sains¹¹⁵. Les EROs sont également induits par de nombreux facteurs exogènes tels que l'exposition prolongée au soleil et aux radiations, le tabagisme, la prise de certains

58

médicaments, la pratique intense d'un sport, la consommation excessive d'alcool et l'exposition aux polluants atmosphériques gazeux (NO₂, O₃) et particulaires^{116–118}.

De nombreuses études ont exposés différents modèles expérimentaux à divers polluants particulaires atmosphériques et ont mis en évidence des variations d'indicateurs de stress oxydant. Ainsi, une augmentation de la production d'EROs, de 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG)¹¹⁹, la présence de cassures de l'ADN, l'altération de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la catalase ou la superoxyde dismutase^{120,121}, des modifications de l'état redox de la cellule¹²² ou de l'expression de certains facteurs de transcription sont souvent utilisés comme des indicateurs de stress oxydant.

Le rapport GSH/GSSG est ainsi considéré comme un indicateur pertinent du degré de stress oxydant subi par la cellule. À un faible niveau de stress oxydant (étape I), la transcription des enzymes anti-oxydantes est induite via l'activation de l'élément de réponse aux anti-oxydants (ARE) par le facteur de transcription Nrf-2, induisant la formation de nombreuses enzymes anti-oxydantes afin de restaurer l'homéostasie redox de la cellule. Ainsi l'hème oxygénase 1 (HO-1), dont l'expression est induite rapidement lors de stress oxydant, constitue donc un bon marqueur du stress oxydant. HO-1 a des fonctions anti-oxydantes et cyto-protectrices, dégradant l'hème en bilirubine et biliverdine, de puissants anti-oxydants. À un niveau intermédiaire de stress oxydant (étape II), l'activation de la cascade des MAP-kinases et du facteur de transcription NF-κB induit la réponse pro-inflammatoire par l'induction de cytokines et de molécules d'adhésion. À un niveau élevé de stress oxydant, se traduisant par un déséquilibre prononcé dans le rapport GSH/GSSG (étape III), le programme de mort cellulaire (apoptose ou nécrose) est activé par le biais de la voie mitochondriale via une désorganisation de la chaîne de transport d'électron¹²³ (Figure 12).



Figure 12 : Hiérarchisation du modèle de stress oxydant en fonction du ratio GSH/GSSG en trois étapes¹²³.

Les particules, telles que les particules de moteurs Diesel, ayant une teneur élevée en composés organiques (HAPs), ont la capacité de se lier au récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), conduisant à la libération de ce dernier et à sa translocation dans le noyau, permettant sa liaison à l'élément de réponse xénobiotique (XRE) dans la région promotrice des gènes cibles (CYP1A1, CYP1B1) afin de stimuler leur transcription. Les CYP jouent un rôle central dans les phénomènes de bio-transformation et/ou de la détoxication des composés étrangers à l'organisme. Il a été proposé que les voies médiées par AhR soient liées à l'activation du Nrf2-keap1. Ainsi, l'activation d'AhR peut initier la dissociation du complexe Nrf-2-keap1 conduisant à la phosphorylation de Nrf-2 et à sa migration dans le noyau où il se lie à la protéine Maf. Ce complexe transcriptionnellement actif reconnaît l'ARE dans les séquences promotrices de gènes cibles tel que HO-1 induisant son expression¹²⁴ (Figure 13).



Figure 13 : Cross-talk entre les voies médiées par AhR et Nrf-2¹²⁴.

Li et son équipe¹¹⁷ se sont intéressés à la matière particulaire ambiante et ont conclu que l'effet majeure de ces particules était l'exacerbation de l'inflammation par la génération d'un stress oxydant via leurs composés chimiques et métaux, en particulier chez les personnes sensibles. Les réponses cellulaires à ce stress oxydant comprennent l'activation de la défense antioxydante, de l'inflammation ainsi qu'une cytotoxicité. Il a également été observé une diminution de la fonction pulmonaire et de l'activité des enzymes anti-oxydantes chez des travailleurs exposés à des concentrations élevées de $PM_{2.5}$ (61 µg/m³) issues de la combustion de biomasse au Brésil¹²⁵.

Des preuves directes de la majoration du stress oxydant en cas d'exposition aux polluants, même à faibles doses, ont pu être établies *in vivo* chez l'homme. En effet, l'équipe de Chuang¹²⁶ a mené une étude sur des jeunes adultes exposés à des polluants atmosphériques urbains au sein de l'université de Taipei afin de relier la pollution atmosphérique aux événements cardiovasculaires. Pour cela, trois mesures de différents marqueurs du stress oxydant ont été effectuées en trois mois chez chaque participant. En conclusion de l'étude, il a été observé des augmentations de la « high-sensitivity C-reactive protein », de la 8-OHdG, du fibrinogène et du « plasminogen activator fibrinogen inhibitor-1 » associées à des augmentations de particules PM₁₀ et PM_{2.5} ainsi qu'une augmentation de la concentration atmosphérique de sulfate, nitrate et ozone. Ces augmentations miment celles observées dans

des pathologies cardiovasculaires et pulmonaires comme l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale ou bien encore la BPCO.

En milieu professionnel, Lee et ses collaborateurs¹²⁷ ont étudié la toxicité des particules issues des nanotubes de carbone chez les ouvriers fabriquant ce matériau. Bien qu'il n'y ait eu aucun impact hématologique, une augmentation des marqueurs de la peroxydation lipidique que sont le malondialdehyde (MDA), le 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) et le n-hexanal a été observée dans les échantillons d'expectorations. Ces aldéhydes peuvent également induire des modifications covalentes de l'ADN pour former des adduits mutagènes^{128,129}. La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité et de la perméabilité de la membrane, une altération des systèmes de transfert d'ions et du fonctionnement de nombreux récepteurs pouvant aboutir à une altération des fonctions cellulaires et des voies de transductions des signaux, voire à la mort cellulaire.

Dans l'étude de Pelclova¹³⁰, des taux significativement élevés de 3-nitrotyrosine, marqueur moléculaire de l'oxydation protéique¹³¹ générée après un stress oxydant, ont également été retrouvés chez des ouvriers exposés à des particules de dioxyde de titane (TiO₂) pendant toute la durée de leur présence sur leur lieu de travail (0,65 et 0,40 mg/m³ annuellement).

Une autre étude sur des ouvriers exposés pendant six mois à des nanotubes de carbones a permis de démontrer l'induction de modifications significatives de l'ADN (apparition de sites abasiques, de cassures simples ou doubles brins et autres pontages de protéines), des profils d'expression des gènes ayant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, dans le contrôle de l'apoptose ainsi que dans la prolifération¹³². L'ADN mitochondrial est considéré comme une cible privilégiée des oxydations par le fait de sa proximité directe avec la chaîne respiratoire mitochondriale, lieu de génération des EROs, par le manque de protection des histones et par la faiblesse de ses systèmes de réparation¹³³. En effet, l'ADN mitochondrial serait en général deux à trois fois plus oxydé que l'ADN nucléaire¹³⁴.

Liou et son équipe ont publié un recueil épidémiologique de quinze études portant sur les effets des nanomatériaux sur les travailleurs¹³⁵. Pour les onze études transversales, toutes ont montré une relation positive entre divers biomarqueurs du stress oxydant et l'exposition aux nanomatériaux. Prises ensemble, ces études suggèrent que l'exposition professionnelle aux nanomatériaux peut avoir des effets préjudiciables sur la santé humaine. Des travaux supplémentaires sont nécessaires à long terme afin de déterminer la nature et l'étendue de ces effets.

D'autres nanoparticules issues d'usines taïwanaises, essentiellement composées d'argent, d'oxyde de fer, d'or, de dioxyde de titane et de silicium, ont induit une augmentation des niveaux d'enzymes anti-oxydantes (SOD et GPx) au niveau cardiovasculaire chez les travailleurs les manipulant pendant une période de six mois¹³⁶.

La majoration du stress oxydant a également été démontrée sur des modèle animaux, comme par exemple dans l'étude de Li, où deux souches de souris ont été exposées à de faibles concentrations de particules de moteur Diesel (100 μ g/m³), induisant l'augmentation de nombreux marqueurs pro-inflammatoires corrélée à une augmentation significative de l'hème oxygénase 1 (HO-1), marqueur robuste d'un stress oxydant¹³⁷.

Outre les modèles in vivo, de nombreux modèles cellulaires in vitro sont également utilisés afin d'évaluer et de mesurer les effets délétères de la pollution atmosphérique et plus précisément de la pollution particulaire. Une étude a été effectuée sur des particules prélevées en milieu rural et urbain en Allemagne en utilisant deux systèmes cellulaires différents ; des cellules épithéliales alvéolaires humaines (modèle A549) et des macrophages pulmonaires (modèle RAW264.7). Sur ces deux modèles, les PM₁₀ ont induit une réponse inflammatoire importante par l'intermédiaire d'une augmentation des taux d'IL-6, d'IL-8 et de TNF-α mais également l'induction d'un stress oxydant par une augmentation de l'activité des enzymes catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD)¹³⁸. Une étude similaire a été effectuée, avec des PM₁₀ et des PM_{2.5} sur ce même modèle de cellules A549, et il a été observé une augmentation de la production de radicaux hydroxyles, la formation de 8-OHdG et de cassures de l'ADN pour les deux types de particules¹³⁹. Choi et son équipe ont également étudié les effets de ces deux classes de particules prélevées en milieu urbain en utilisant un modèle de cellules épithéliales pulmonaires de rat. Ils ont observé, pour une masse de particules identique, un effet significativement plus nocif des PM_{2.5} en ce qui concerne la viabilité cellulaire, la fragmentation de l'ADN et l'activation d'enzymes réparatrices de l'ADN¹⁴⁰.

Toutefois, ces particules de même taille ayant une origine différente (urbaine ou rurale) sont soumises à des effets variables. En effet, les particules urbaines, issues principalement du trafic routier, semblent induire des effets plus prononcés au niveau des cassures de l'ADN. En effet, les particules issues de moteurs Diesel peuvent être à l'origine de la génération de radicaux libres ('OH et O_2^{-}) et d'EROs non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par les cellules pulmonaires endothéliales et les cardiomyocytes ainsi que d'une diminution du taux GSH/GSSG intra-cellulaire¹⁴¹.

Comme expliqué dans les chapitres précédents, les particules sont composées d'un ensemble hétérogène de composés organiques comme les HAPs ou COVs et de métaux de transitions¹⁴² et cette variabilité de composition des particules représente un facteur déterminant dans les effets néfastes qu'elles peuvent engendrer. En effet, les PM ayant une forte proportion de

métaux de transition (Fe, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, et Ti) peuvent catalyser la réaction de Fenton et générer de grandes quantités d'EROs¹⁴³.

Quelques études ont également déterminé le potentiel oxydant intrinsèque de particules fines atmosphériques, par exemple en mesurant la capacité des particules à catalyser la génération d'EROs ou encore à former des radicaux hydroxyle (OH⁻) dans un environnement oxydant *in vitro*¹⁴⁴. L'étude de Cho montre que l'activité d'oxydo-réduction intrinsèque à des particules a été la plus élevée dans la fraction particulaire ultrafine collectée dans différents sites du bassin de Los Angeles¹⁴⁵.

b. Inflammation et particules

Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, il est rapidement éliminé par les phagocytes présents initialement au niveau du site d'exposition. Dans le cas où la réponse phagocytaire est débordée ou si le pathogène induit des dommages tissulaires, des processus de défenses se mettent en place. Un de ces processus majeur est la réponse inflammatoire. L'inflammation est une réponse biologique complexe de type immunitaire face à une agression ; soit par un agent pathogène exogène qui peut être infectieux (virus), de nature physique (irradiation, brûlure) ou chimique (composés associés aux particules atmosphériques) ; soit par des agents endogènes lorsqu'une cellule est endommagée ou au cours de pathologies auto-immunes. La réaction inflammatoire a pour principale rôle de permettre l'acheminement des cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages) sur le lieu de l'inflammation.

En cas de dysfonctionnement des systèmes de défenses (clairance pulmonaire, phagocytose) ou d'un épisode de forte concentration en particules, ces dernières peuvent s'accumuler localement au sein de l'appareil respiratoire. Cette accumulation va déclencher une réaction inflammatoire locale, contrôlée par l'interaction de nombreux médiateurs, pouvant s'étendre au niveau systémique et entraîner diverses pathologies. De plus, la présence des particules peut entraîner une modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un autre agent pathogène Les médiateurs inflammatoires ont une action synergique qui va permettre le recrutement de cellules phagocytaires, l'élimination du pathogène puis la réparation de la lésion. Les médiateurs d'origine cellulaire sont essentiellement issus de la sécrétion des mastocytes, des leucocytes et des plaquettes. Les cytokines appartiennent à ce groupe et sont des glycoprotéines de faibles poids moléculaire (8 à 50 kDa), solubles ou membranaires. Les cytokines assurent le rôle de communication entre les cellules participant à différents processus physiologiques comme la prolifération et différenciation cellulaire ou encore à l'activation des cellules immunes, tout en orientant la réponse immunitaire en fonction de la nature du pathogène détecté. Grâce à leur haute affinité envers des récepteurs membranaires,

les cytokines peuvent agir à de faibles concentrations sur les cellules à proximité de leur lieu de synthèse (action paracrine) ou sur les cellules qui les ont synthétisées (action autocrine). En de plus rares occasions, elles ont également la capacité d'emprunter les systèmes circulatoires afin d'agir sur les cellules plus éloignées (action endocrine) malgré leur durée de vie plutôt courte. Le terme cytokines regroupe les interleukines, les interférons, les facteurs de nécrose (Tumor Necrosis Factor, TNF) et les chimiokines (cytokines aux propriétés chimiotactiques). De nombreuses études ont pour sujet la réponse inflammatoire suite à l'exposition d'un pathogène et quelques cytokines pro-inflammatoires ressortent systématiquement. Il s'agit du Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), de l'interleukine 1 β (IL-1 β) et de l'interleukine 6 (IL-6) que l'on nomme plus communément la « triade inflammatoire ». Ce trio de cytokines est toujours retrouvé au niveau du site inflammatoire et joue un rôle important dans l'activation et le déroulement de l'inflammation. A ces cytokines s'ajoutent également l'interleukine 8 (IL-8) et la chimiokine Monocyte Chimoattractant Protein 1 (MCP-1).

Le TNF- α a pour rôle d'induire l'expression de molécules d'adhérences et la production de chimiokines par les cellules endothéliales, permettant le recrutement des leucocytes (neutrophiles, éosinophiles, monocytes). C'est également un facteur déclenchant de la phagocytose et de l'initiation de la réponse inflammatoire adaptative¹⁴⁶. Il lui est également assimilé le rôle de facteur de croissance, facteur nécessaire et indispensable à l'étape de réparation/cicatrisation de la réponse inflammatoire¹⁴⁷.

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire souvent considérée comme une molécule d'alarme, sécrétée par les macrophages mais aussi par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes T et B en réponse à différents stimuli tels que le TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , les lipopolysaccharides, des virus et tout autre antigène. C'est un médiateur incontournable de la réponse immunitaire et de l'inflammation par son rôle dans l'adhésion des monocytes et neutrophiles, en tant que chimio-attracteur des leucocytes, activation des cellules T helper et inducteur de la prolifération des lymphocytes B¹⁴⁸.

L'interleukine-6 est une cytokine pro-inflammatoire produite par de nombreuses cellules du système immunitaire (macrophages et cellules dendritiques) ainsi que par les cellules endothéliales. L'IL-6 intervient principalement par la stimulation de la production hépatocytaire des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (CRP, protéines du complément, fibrinogène etc). L'IL-6 stimule également la production de molécules intervenant dans les processus de réparation tissulaire et peut également jouer un rôle anti-inflammatoire en inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- α ou l'IFN- γ^{149} . Cette cytokine intervient aussi dans les mécanismes de l'immunité en favorisant la différenciation des lymphocytes B

en plasmocytes, en stimulant la prolifération des lymphocytes T en association avec l'IL-2 et en favorisant la génération de lymphocytes T cytotoxiques¹⁵⁰.

L'interleukine-8 est l'une des chimiokines les plus étudiées dans la réaction inflammatoire et a pour propriété principale d'attirer les leucocytes circulants, particulièrement les polynucléaires neutrophiles, vers un foyer inflammatoire¹⁵¹. Elle permet également l'activation de ces derniers par l'induction de cyclooxygénase, de lipooxygénase et de NO-synthase. De nombreuses cellules stimulées par l'IL-1 ou les TNF- α (monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, hépatocytes...) produisent de l'IL-8 en condition de stress inflammatoire¹⁵².

Au fil des études, l'inflammation est apparue comme le vecteur principal des pathologies cardio-respiratoires associées à la pollution atmosphérique et plus particulièrement aux particules¹⁵³. En effet, les cellules épithéliales pulmonaires participent directement à la réponse en libérant des médiateurs capables d'activer les cellules du système immunitaire que sont les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales elles-mêmes. Une fois l'inflammation initiée, il a donc été observé un afflux de polynucléaires neutrophiles, une augmentation des quantités de protéines dans le liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA) et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les particules inhalées ou la réponse inflammatoire résultant de cette inhalation stimulent également les récepteurs sensoriels alvéolaires¹⁵⁴, fournissant un signal au système nerveux autonome qui régule directement la fonction cardiaque et, indirectement d'autres aspects du système cardiovasculaire^{155,156}.

Il a été démontré dans diverses études qu'après l'exposition de rats à des PM_{10} et $PM_{2.5}$, soit par instillation intra trachéale soit par inhalation, les taux d'IL-6 et de TNF- α retrouvés dans des LBA étaient significativement augmentés^{157,158}. Un taux de TNF- α augmenté a également été retrouvé chez des souris après 90 min d'exposition à des particules de moteurs Diesel¹⁵⁹.

D'autres études ont été réalisées sur différents modèles cellulaires, essentiellement sur des modèles de cellules épithéliales et sur des macrophages. Happo et son équipe, sur le modèle de macrophages (RAW 264.7)¹⁶⁰ et Musah et ses collaborateurs, sur un modèle de co-culture de macrophages (RAW 264.7) et de cellules épithéliales pulmonaires (MLE-12)¹⁶¹ ont observé une augmentation de la production de TNF- α après 24h d'exposition à des particules en suspension. Une augmentation du taux d'IL-6, de TNF- α , d'IL-1 α et de MCP-1 a également été retrouvée après exposition de cellules macrophagiques alvéolaires de souris à des particules fines¹⁶². Une augmentation de la production épithéliale d'interleukines 6, 8 et 1 β ¹⁶³ et de l'expression cellulaire NF- κ B et de TNF- α a été rapportée après exposition de cultures de cellules humaines à des particules ¹⁶⁴.

Cette réaction inflammatoire serait en partie due à la taille et à la surface spécifique des particules. Les particules les plus fines seraient capables de traverser les barrières de l'organisme et pénétrer dans les cellules jusque dans les organites intra-cellulaires. En effet, des observations en microscopie électronique comparant la pénétration des PM₁₀, PM_{2.5} et PM_{0.1}, montrent que les particules ultrafines peuvent être localisées dans les mitochondries entraînant ainsi une dysfonction de la fonction mitochondriale et même la mort programmée de la cellule¹⁶⁵. En plus de leur effet toxique envers les macromolécules cellulaires, certaines études montrent que les particules joueraient également un rôle dans la réponse inflammatoire en tant que messager intra et intercellulaire dans certaines voies de signalisations. En effet, il a été démontré que les PM₁₀ présentant une teneur élevée en métaux, pourraient induire l'activation du facteur de transcription NF-kB, utilisé comme indicateur de l'induction d'un stress oxydant et comme inducteur de la réponse pro-inflammatoire par la production de cytokines comme par exemple l'IL-6 ou encore le TNF- α^{123} . L'équipe de Monteiller, lors d'une étude comparative de l'effet de particules de tailles différentes sur des cellules épithéliales A549, a observé une augmentation de la sécrétion d'IL-8 variable selon la taille des particules tout en gardant la même concentration¹⁶⁶. La surface spécifique joue également un rôle important, puisque plus cette surface sera élevée, plus il y aura de sites de réactions disponibles avec les différentes molécules se situant au niveau du foyer inflammatoire¹⁶⁷. La composition des particules a également son importance. Des agents mutagènes tels que les HAPs ou encore les métaux adsorbés à leur surface, peuvent induire l'inflammation¹⁶⁸ ou la formation d'adduits à l'ADN conduisant à l'augmentation du risque de cancer¹⁴². Quatre échantillons de PM_{2.5} issus de la pollution parisienne ont été testés sur des cellules épithéliales bronchiques humaines. Une libération de GM-CSF et de cytokines pro-inflammatoires a été observée. Il a été également montré que les métaux et les HAPs composant les différents échantillons particulaires étaient responsables d'une production d'EROs intracellulaires conduisant à l'activation des voies de signalisation de facteurs pro-inflammatoire¹⁶⁹. Cette idée que la taille, la composition et l'origine des PM pourraient interagir de manière conjointe a été appuyée par de nombreuses études, comme celle de Dergham et son équipe démontrant que l'exposition de cellules BEAS-2B à des PM_{2.5} issues d'un milieu urbain et rural, induisaient l'expression génique différentielle d'enzymes métabolisant les xénobiotiques (c'est-à-dire les cytochromes P450 et dans une moindre mesure les NADPH-Quinone oxydoréductase-1), des lésions oxydatives (c'est-à-dire la formation de 8-OHdG, la production de MDA et la modification du statut glutathionique (GSH/GSSG)) ainsi que l'expression de gènes et/ou la sécrétion de protéines de médiateurs inflammatoires (IL-6 et IL-8)¹⁷⁰.

c. Mutagénicité/génotoxicité et particules

L'exposition chronique aux particules atmosphériques fines constitue une cause de mortalité par cancers et ces particules ont été classées dans le groupe 1 par le CIRC. De nombreux travaux ont porté sur l'évaluation du caractère mutagène des particules Diesel, même si un caractère mutagène n'implique pas automatiquement la formation de cancers. Le test d'Ames utilise différentes souches bactériennes de Salmonella Typhimurium permettant de déterminer le potentiel mutagène de composés chimiques. La mutagénicité des matières organiques particulaires en suspension dans l'air est due à au moins 500 composés provenant de différentes classes chimiques, la seule présence d'HAPs ne pouvant pas expliquer la majorité de l'activité mutagène¹⁷¹. Les sources mobiles (automobiles, camions, etc) contribuent de manière significative au niveau des particules mutagènes atmopshériques^{172–174}. Les concentrations atmosphériques de Pb, Zn, V et Cd seraient liées à la mutagénicité directe des matières organiques particulaires¹⁷⁵. Ces métaux sont émis à partir de sources telles que les automobiles, les appareils de chauffage domestique et d'autres sources de combustion. Kuo et ses collaborateurs ont de leur côté établi une corrélation positive entre la mutagénicité indirecte et la présence d'HAPs émis par les moteurs diesel et essence dans la ville de Taichung à Taiwan¹⁷⁴.

Lepers et son équipe¹⁷⁶ ont quant à eux évalué la mutagénicité et la génotoxicité de PM_{2.5} collectés sur la zone portuaire de Dunkerque et ses alentours au cours de deux saisons de prélèvement. Ce travail a mis en évidence le potentiel mutagène intrinsèque des particules, très probablement lié majoritairement à la présence de composés nitro-aromatiques¹⁷⁶. Ces PM_{2.5} sont capables de former des adduits encombrants de HAPs et de HAPs nitrés, ainsi que de provoquer des cassures et des sites abasiques dans l'ADN des cellules BEAS-2B exposées. Ces particules sont également responsables d'une nette augmentation des anomalies de ségrégation des chromosomes dans les cellules exposées. Ces altérations de l'ADN induites par les PM_{2.5}, si elles ne sont pas réparées, pourraient être à l'origine de mutations potentiellement capables d'initier un phénomène de cancérogenèse¹⁷⁶.

Des marqueurs de la génotoxicité (bases oxydées de l'ADN, adduits encombrants) ont été documentés dans des études de biosurveillance chez l'homme et ont conduit à des associations positives entre particules fines et dommages à l'ADN^{177,178}. Il a été démontré que la production d'EROs médiée par des particules est impliquée dans la production d'inflammation et que les cellules inflammatoires une fois activées peuvent augmenter leur production d'EROs. Les observations indiquent que les particules de pollution atmosphérique peuvent donc générer un ADN oxydé par la promotion de condition de stress oxydatif et d'inflammation¹⁷⁹.

L'exposition de rongeurs à la pollution atmosphérique liée à la circulation ou aux particules de moteurs Diesel a conduit au développement d'adénomes pulmonaires accrus^{180,181}. Le mécanisme cancérogène proposé impliquerait une génotoxicité passant par la formation de dommages oxydatifs et par la formation d'adduits à l'ADN à partir d'HAPs, qui peuvent donner lieu à des mutations¹⁸².

IV- Activité pyrotechnique et particules

La pyrotechnie est définie comme la science de la combustion des matériaux énergétiques destinée à produire un effet calorifique, lumineux, sonore, gazeux ou fumigène ; ou une combinaison de ces effets, à la suite de réactions chimiques exothermiques autoentretenues non détonantes sans participation de l'oxygène de l'air.

Les matériaux énergétiques sont des matériaux capables de restituer à la demande, par un mécanisme d'oxydo-réduction et en l'absence d'oxygène, l'énergie chimique emmagasinée dans les édifices moléculaires qui entrent dans leur composition. La restitution de l'énergie stockée dans les matériaux énergétiques s'effectue à la demande par des mécanismes tels que la décomposition rapide par combustion et les mécanismes d'oxydoréduction intra-moléculaires. On distingue trois régimes de restitution de l'énergie : la combustion (< 300 m/s), la déflagration et la détonation (> 3 000 m/s couplé à une onde de choc). Un grand nombre de substances énergétiques est représenté par des substances nitrées, comme par exemple les esters de nitrate aliphatiques (nitroglycérine, nitrocellulose), les nitroaromatiques (trinitrotoluène), les nitramines¹⁸³.

1- Feux d'artifice

Historiquement, la pyrotechnie trouve son application dans la guerre, dès le VIIe siècle chez les Grecs byzantins pour le lancement du feu grégeois. Les feux d'artifice ont également été utilisés dans le domaine festif, notamment en Chine et en Inde. Cette utilisation festive et artistique est toujours d'actualité et peut être à l'origine d'effets délétères chez l'homme. Ainsi, la fête de l'indépendance aux USA, la célébration de la coupe de monde de football¹⁸⁴, des festivals en Chine¹⁸⁵, Inde¹⁸⁶, Espagne¹⁸⁷ ou encore le jour de l'an¹⁸⁸, sont autant d'événements festifs associés à une augmentation drastique du taux de particules en suspension dans l'atmosphère (PM₁₀), avec en particulier une augmentation de la fraction très fine (PM_{1.0}), voire ultrafine (PM_{0.1}). Dans une étude de Song, les concentrations moyennes de PM₁₀ et PM_{2.5} rapportées sont 4 à 6 fois supérieures aux niveaux habituels suite à 2 à 4 heures de tir de feux d'artifice lors du nouvel an. Il a fallu 2 à 3 jours retrouver des concentrations normales¹⁸⁹. Outre la taille des particules émises, la chimie des émissions issues de fumigènes et de feux d'artifices est complexe mais toujours caractérisée par des quantités importantes de métaux utilisés comme colorants, associés à des oxydants tels que des dérivés nitrés, des sulfates, des perchlorates¹⁹⁰.

Les effets sur la santé de tels cocktails chimiques sous la forme de particules de taille micrométrique voire nanométrique restent très peu connus. Ce constat est d'autant plus préoccupant que les activités pyrotechniques ne sont pas exclusivement réservées aux activités sociales et culturelles mais touchent également d'autres domaines tels que ceux de
la sécurité, de l'armement, de la signalisation, de l'aérospatiale et de la protection dans des secteurs allant de l'agriculture à la Défense. Ces émissions, compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques et des quantités émises, peuvent contribuer à la dégradation de la qualité de l'air et avoir un impact sanitaire sur les populations civiles en milieu urbain mais aussi sur les professionnels exposés aux fumées émises lors d'activités pyrotechniques.

2- Particules de tir

Les armées françaises et celles du monde entier utilisent de nombreux systèmes d'armes pyrotechniques utilisant des matériaux énergétiques. Par une réaction d'oxydo-réduction rapide, autonome et exothermique, ces derniers produisent de grands volumes de gaz chauds associés en un aérosol complexe composé de différentes particules. Ces « fumées de tir » ont dès la 1^{ère} Guerre Mondiale fait la preuve de leur toxicité, notamment avec des intoxications aiguës en milieu confiné chez des servants de mitrailleuse lourde (CO) et des artilleurs embarqués (NOx)¹⁹¹. Le servant peut être exposé aux fumées de tir de gros calibre sur une durée très brève, le plus souvent de l'ordre de la minute. Au contraire, dans un stand de tir pour armement de petit calibre, une séance de tir durera une journée entière, avec la consommation de centaines de cartouches, où l'exposition sera donc plus longue et répétée. En effet, lors de la décharge d'une arme à feu, de petites particules contenant des résidus d'amorce, de poudre, de fumée, des particules de graisse ou de lubrifiant ainsi que de résidus métalliques provenant du projectile, de la douille et/ou de l'arme sont émis en aérosol. Pour information, expliquons simplement comment se structure une munition (Figure 14). Une munition se compose d'une douille ou encore appelée cartouche, creuse et remplie de poudre, sur laquelle est sertie une balle, élément qui sera propulsé dans le canon après réaction chimique au sein de la poudre produisant une grande quantité de chaleur et de gaz, après que cette dernière se soit enflammée. La poudre au sein de la cartouche s'enflamme par un procédé pyrotechnique complexe via l'amorce qui est communément sertie à l'arrière de la balle au niveau du culot afin d'être frappée par le percuteur suite à la pression de la détente de l'arme. Lors d'un tir, la cartouche vide est éjectée pour faire place à une nouvelle cartouche.



Figure 14 : Structure classique d'une munition d'arme à feu.

Lorsque les particules solides de l'amorce et de la charge propulsive sortent de la bouche du canon, elles vont refroidir très rapidement du fait de l'expansion très rapide des gaz contenant ces résidus. Les composés de l'amorce, vont alors se condenser et former des particules caractéristiques plus ou moins sphériques.

Les résidus d'amorce sont constitués essentiellement de métaux lourds (Baryum, Antimoine, Plomb) alors que les résidus de poudre sont des résidus organiques, majoritairement des composés nitrés (nitrates, nitrites)¹⁹². Les résidus de fumées, quant à eux, sont composés principalement de carbone, mais peuvent contenir des métaux vaporisés provenant de l'amorce, du projectile ou de la douille¹⁹³. Ces résidus de fumées peuvent donner une indication importante lors d'enquête policière puisque lorsqu'une arme se trouve proche d'une cible, la fumée dégagée par la bouche du canon peut se déposer sur les surfaces proches.

L'exposition dépend également fortement des conditions de ventilation, c'est-à-dire du confinement du pas de tir (en milieu fermé) et des variables météorologiques (en milieu ouvert). Le personnel civil et militaire peut être exposé fréquemment aux fumées de tir, aussi bien dans le cadre professionnel que de loisirs (club de tir)¹⁹⁴.

Les effets sanitaires découlant de l'exposition aux particules de tir prélevées sur stand de tir lors de séance d'entraînement de la gendarmerie seront évalués et discutés dans la partie « Résultats et Discussion ».

3- Fumigènes

Au cœur du domaine qu'englobent les activités pyrotechniques, les fumigènes représentent une source importante de production de particules. Les fumigènes sont composés de petites particules solides ou liquides en suspension dans le milieu aérien et sont utilisés dans de multiples domaines, que ce soit dans le domaine civil, professionnel ou militaire ; notamment au sein de l'armée. En effet, les fumigènes ont été utilisés pour la 1^{ère} fois lors d'une opération offensive de la Première Guerre Mondiale afin de cacher à l'ennemi la position et la progression des troupes américaines sur un terrain exposé aux tirs d'artilleries et afin de signaler une zone précise aux unités aériennes. Depuis, les fumigènes remplissent de nombreuses fonctions ; ils peuvent être utilisés à des fins de signalisation ou bien servir de camouflage ou être à but obscurcissant, en émettant des particules en suspension dans l'air bloquant ou diminuent la transmission de certaines radiations du spectre électromagnétique, telles que par exemple la lumière visible, infrarouge, voire les radiations micro-ondes. L'efficacité d'un fumigène obscurcissant ou de dépistage dépend de sa capacité de réfraction et de diffusion des rayons lumineux ainsi que sa capacité à réduire la visibilité par réflexion. C'est pour cette raison que ces fumigènes sont constitués d'aérosols particulaires s'approchant de la longueur d'onde visible et de la lumière infrarouge. Lorsque la concentration de particules augmente dans le nuage, l'efficacité du fumigène augmente comme indigué par la visibilité décroissante (Tableau 6).

Fumigènes	Visibilité (m ³)	Concentration (mg/m ³)
	10	62
Fumigène « Red Phosphorus » (humidité relative 50%)	50	12
	200	3,1
	10	69
Fumigène « Hexachloroéthane » (humidité relative 85%)	50	14
	200	3,5

Tableau 6 : Corrélation entre la visibilité et concentration de fumigène pour deux fumigènes différents. Adapté de ¹⁹⁵.

Ils peuvent également servir à la dispersion de foule afin de maintenir l'ordre lors de manifestations publiques ou être utilisés dans le domaine civil et de la sécurité avec l'utilisation par exemple de fumigènes anti-intrusions.

a. Principales familles de fumigènes

La composition d'un fumigène varie d'un type de fumigène à l'autre, essentiellement en fonction du rôle qu'il est censé remplir. Néanmoins, ces derniers sont cependant tous composés d'au moins un oxydant (souvent du chlorate de potassium ou du nitrate de potassium) et d'un carburant (cellulose, lactose, sucre, etc.).

Il existe encore peu de résultats scientifiques disponibles dans la littérature concernant la toxicité des fumées émises par les fumigènes mais le département médical de l'armée des États-Unis a édité trois livres intitulés « Toxicity of military smokes and obscurants », volume 1, 2 et 3, respectivement publiés en 1997, 1999 et 1999^{195–197}. Dans ces volumes, six familles de fumigènes apparaissent selon leur composition : les fumigènes à base d'hexachloroéthane (HC) ou (HCE), les fumigènes à base de phosphore rouge (RP), les fumigènes à base d'anthracène, les fumigènes à base de potassium et magnésium (KM), les fumigènes colorés et les fumigènes à base d'acide téréphtalique (TPA).

Fumigènes à base d'hexachloroéthane :

Les fumigènes HC sont essentiellement utilisés à des fins de camouflage, de dissimulation d'objets ou de troupes. Ils sont généralement conditionnés en grenades à main ou en pots métalliques et sont utilisés comme tirs d'artilleries ou de mortiers, comme grenades et bombes aériennes. Leur composition est essentiellement un mélange binaire contenant un oxydant ou un donneur de chlore (essentiellement un hydrocarbure chloré, l'HCE), et un combustible métallique comme par exemple le Zn, ZnO (Oxyde de zinc), Al, Si ou TiO₂. Lors de sa combustion, une réaction exothermique a lieu entre le combustible et l'oxydant, et un chlorure de métal est produit¹⁹⁸.

Les chlorures métalliques sont hygroscopiques (tendance à absorber l'humidité de l'air) et réagissent avec l'humidité dans l'air. Ainsi, le rendement de l'aérosol en rapport avec l'épaisseur de la fumée produite, à savoir la capacité de dissimulation, dépend de l'humidité relative (HR) de l'air. Le produit principal de la réaction entre l'HC et le Zn est le chlorure de zinc (ZnCl₂) et la fumée produite est de couleur blanche et a une excellente capacité de dissimulation. Dans la réaction secondaire avec l'humidité de l'air, le fumigène HC/Zn produit de l'hydroxyle chlorure de zinc (Zn(OH)Cl) et de l'acide chlorhydrique (HCl)¹⁹⁹. La composition de ce fumigène dans l'utilisation militaire contient de l'HC, du Zn et du 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) en tant qu'additif. Le rôle du TNT est de stabiliser la composition du fumigène contre les effets de l'humidité et de faciliter l'allumage dans des conditions météorologiques froides et humides.

Fumigènes RP :

En ce qui concerne les fumigènes à base de phosphore, il faut savoir que deux formes du phosphore élémentaire, le phosphore blanc (WP) et le phosphore rouge (RP), ont été utilisées pour la production de fumigène²⁰⁰. Le WP a un point de fusion bas et a donc une tendance à l'auto allumage en contact avec l'air qui complique son utilisation en tant que fumigène. Le RP est une substance amorphe, solide jusqu'à 416° C et contrairement à son homologue blanc n'a aucune tendance à l'auto allumage, avant une température de combustion de 280° C. Après combustion, le fumigène WP produit un vaste nuage de fumée blanche avec une excellente performance d'opacité, permettant le blocage de la transmission d'une partie particulière du spectre électromagnétique, comme la lumière visible, la lumière infrarouge ou les micro-ondes. Le WP est l'agent de fumée le plus efficace pour contrer les systèmes d'imagerie thermique. Le fumigène RP, quant à lui, génère une intense fumée rouge, permettant la signalisation d'un point géographique précis, permettant le guidage à longue distance lors de manœuvre d'exploration. En utilisation sur le terrain de l'armée, ces fumigènes à base de phosphore sont déployés de manière explosive à partir de grenades et de coquilles de mortier. Les gouttelettes brûlantes tombent ensuite sur le sol et peuvent facilement enflammer les matières organiques et provoquer des incendies de forêt, ce qui limite grandement l'utilisation de ces fumigènes lors de certaines conditions saisonnières et météorologiques.

Dans la réaction secondaire avec l'humidité de l'air, de l'acide phosphorique (H₃PO₄) est produit dans un mélange complexe de polymères. La proportion relative des différents composés dans la fumée émise change avec le temps après sa génération, même si H₃PO₄ reste le composant prédominant. Afin d'améliorer la capacité de camouflage dans la gamme infrarouge, des produits chimiques supplémentaires tels que les métaux ou les oxydes métalliques peuvent être ajoutés, qui réagiront également lors de la combustion.

Fumigènes colorés :

Les fumigènes colorés sont généralement utilisés à des fins de signalisation. Différentes couleurs sont utilisées en fonction des conditions météorologiques, la lumière disponible et le contraste du paysage. Ils sont composés d'un oxydant, d'un combustible, d'un colorant organique et de certains additifs qui facilitent l'allumage et la combustion²⁰¹. Le chlorate de potassium (KCIO₃) est fréquemment utilisé comme comburant et le lactose comme combustible. Les formulations des fumigènes colorés utilisés par le domaine militaire contiennent généralement du KCIO₃, du lactose et différents colorants en fonction de la couleur du fumigène : le 1,4-dihydroxy anthraquinone (orange), le 1-(p-tolylamino)-4-hydroxy-anthraquinone (violet), le 1-méthylamino anthraquinone (rouge), et le 4,4'-méthylidyne-bis-3-méthyl-1-phényl-2-pyrazoline-5-one (jaune). La chaleur émise lors de la combustion est

utilisée pour sublimer le colorant et la pression des gaz formés permet l'expulsion des colorants volatils hors du récipient contenant le mélange pyrotechnique. Immédiatement après avoir été libérées de la boîte métallique, les molécules de colorant se refroidissent et se condensent pour former un aérosol de petites particules qui donnent à la fumée sa couleur caractéristique.

Fumigènes TPA :

Les fumigènes à base d'acide téréphtalique (TPA)²⁰² produisent naturellement une fumée de couleur blanche et grâce à leur propriété opaque, sont également utilisés pour le camouflage. Ces fumigènes sont composés principalement de KCIO₃, de sucre et d'acide téréphtalique comme pigment, remplaçant le colorant. Lors de la combustion, il y a production d'un aérosol blanc dense constitué principalement de particules de TPA sublimées et recondensées.

Fumigènes KM :

Les fumigènes à base de potassium et magnésium (KM) sont composés principalement de magnésium (Mg), de nitrate de potassium (KNO₃), de perchlorate de potassium (KClO₄) et d'azodicarbonamide²⁰². Le chlorure de potassium (KCl) produit lors de la combustion réagit grandement à haute humidité relative (HR) augmentant ainsi la taille des particules, le rendement et la capacité à dissimuler une cible. La famille de fumigène KM montre donc la meilleure efficacité en conditions très humides (HR> 90%).

Les fumigènes à base d'anthracène :

Les fumigènes à base d'anthracène sont essentiellement utilisés comme balises flottantes produisant de grande quantité de fumée par les forces maritimes afin de signaler une géolocalisation ou bien afin de dissimuler un navire sur des zones aquatiques²⁰³. Ces bouées flottantes productrices de fumée se composent principalement de chlorate de potassium (KClO₃), d'anthracène et de chlorure d'ammonium (NH₄Cl). La combustion de cette famille de fumigène produit une épaisse fumée blanche jaunâtre qui a une capacité de signalisation extrêmement performante. Ces bouées/fumigènes peuvent peser jusqu'à des dizaines de kilogrammes permettant, dans des conditions favorables météorologiques, l'émission d'un écran de fumée ayant des dimensions physiques extrêmement volumineuses, pouvant s'étendre sur plusieurs centaines de mètres permettant ainsi le camouflage de navires entiers.

b. Effets sanitaires des fumigènes

Les fumigènes sont largement utilisés dans les opérations militaires pour obscurcir la vision de l'ennemi, camoufler des objets ou des unités ainsi que pour signaler une position. Les militaires sont exposés donc aux fumées au cours des nombreuses opérations auxquelles ils participent ainsi que lors de leur entraînement. Depuis ces vingt dernières années, les conséquences pour la santé humaine de l'inhalation de fumées issues du monde

pyrotechnique sont apparues comme une préoccupation importante au sein des armées, d'autant plus qu'il n'est pas impossible que des personnes civiles soient exposées à des fumées en habitant à proximité des sites d'entraînement ou en cas de mauvaise utilisation intentionnelle de ces fumigènes. Malgré la faible quantité de données sur la toxicité des fumigènes, quelques études se sont tout de même penchées sur les effets indésirables et toxiques que peuvent provoquer les différentes familles de fumigène.

Il est décrit dans la littérature que les fumigènes les plus communément utilisés sont des fumigènes issus de la combustion de mélanges d'hydrocarbures chlorés, en particulier l'hexachloroéthane, et de catalyseur métallique comme l'oxyde de zinc (HC/ZnO) ou le dioxyde de titane (HC/TiO₂). La combustion d'un mélange à base de zinc conduit à la formation de chlorure de zinc (ZnCl₂) dans ces fumées qui, en cas d'inhalation, peuvent provoquer des effets respiratoires allant d'une simple irritation des voies aériennes supérieures à des effets plus graves comme une pneumopathie toxique, un œdème aigu du poumon²⁰⁴, une fibrose pulmonaire¹⁹⁹ ou encore un syndrome de détresse respiratoire pouvant entraîner la mort²⁰⁵. En raison des risques pour la santé liés à l'utilisation, un projet a été lancé par le Centre de Recherche Technique des Forces de Défense en Finlande (Defence Forces Technical Research Centre) dans le but d'étudier la toxicité de différents fumigènes et ainsi examiner s'il était possible de remplacer ce fumigène toxique par un autre fumigène de composition nontoxique²⁰⁵.

Les risques toxiques liés à l'excès d'inhalation du fumigène à base d'HC et de zinc (HC/Zn), sont les risques sanitaires les mieux connus et documentés au sein de la littérature, du fait des différents effets toxiques qu'il a engendre chez l'homme lors d'accidents. Les symptômes après l'exposition au fumigène HC/Zn sont une irritation des voies respiratoires supérieures, des difficultés à respirer, une constriction thoracique, des douleurs rétrosternales, un enrouement, des toux et l'expectoration²⁰⁶. La fumée secondaire composée de ZnCl₂ est corrosive et astringente pour les muqueuses respiratoires et gastro-intestinales conduisant à une dénaturation des protéines, à l'inflammation, à la nécrose et à la formation d'escarres de la muqueuse des voies respiratoires²⁰⁷. Cette dernière a également été rapportée comme faiblement mutagène pour les bactéries dans le test d'Ames^{208,209}. Dans une étude complète sur les fumigènes à base d'HC, le Conseil de Recherche National Américain (US National Research Council) a conclu que, contrairement à son homologue toxique, le fumigène à base de HC/TiO₂ n'était pas à considérer comme un risque élevé pour la santé après son inhalation, à moins qu'il soit sous une forme particulaire ultra-fine. En effet, aucun des changements défavorables observés, après exposition par inhalation chez la souris, n'a été considéré comme irréversible²¹⁰.

L'irritation des voies respiratoires, l'inflammation, des nausées sont également les symptômes liés à l'exposition au fumigène à base de RP chez les humains et les animaux. Chez les rats, des lésions laryngées et trachéales ainsi qu'un œdème pulmonaire et l'apparition de détresse respiratoire sont des effets typiques pulmonaires retrouvés après 1h d'exposition à des concentrations variables de fumigène RP²⁰⁰. Tout comme pour les fumigènes à base d'HC, aucune preuve claire de génotoxicité des fumées à base de phosphore n'a été trouvée dans la littérature.

La toxicité d'une grenade fumigène rouge M18 utilisant comme colorant le 1-(méthylamino)anthraquinone et le soufre comme combustible a été évaluée lors d'une étude d'Owens en 1974²¹¹. Une mortalité ainsi qu'une irritation des voies respiratoires supérieures et une salivation excessive ont été décrites au cours d'une période d'observation de 30 jours chez plusieurs espèces animales exposées à cette fumée entre 10 min et 2 h.

En ce qui concerne l'exposition aux fumigènes à base de TPA, de KM²⁰² et d'anthracène²⁰³, ces fumigènes induiraient des irritations des fosses nasales et des voies respiratoires inférieures ainsi des toux et nausées sans tout du moins induire de toxicité avérée et irréversible. Lors d'une étude conduite par Hemmilä, la toxicité aiguë et la génotoxicité de quatre fumées colorées (orange, rouge, violet, jaune) ont été étudiées par une méthode *in vitro* basée sur l'exposition de cultures de cellules épithéliales bronchiques humaines aux fumées. La toxicité des quatre fumigènes colorés a été comparée à celle de d'une fumée à base d'hexachloroéthane (HC) utilisé comme fumigène de référence, ayant une toxicité connue. Toutes les fumées colorées ont présenté une toxicité aiguë lors des tests cytotoxiques et l'ordre de toxicité observé a été orange> violet> HC> jaune. Quant à la fumée rouge, cette dernière a montré une faible génotoxicité uniquement dans la série de test utilisant le plus haut niveau de concentration²⁰¹.

Ces différentes études sur la toxicité de ces différents fumigènes démontrent bien que la toxicité associée à leur inhalation dépend fortement de leur composition et des produits potentiellement toxiques formés à suite de leur combustion.

4- Réglementation et protection professionnelle

L'armée utilise différents fumigènes lors de leur opération sur le terrain ainsi que lors de l'entraînement et la formation du personnel militaire. De ce fait, les militaires peuvent être hypothétiquement exposés aux différentes fumées et particules émises par les nombreuses activités pyrotechniques que regroupe le domaine militaire. Pour répondre à cette attente, il a été demandé au Conseil National de Recherche (CNR)¹⁹⁵ des Etats-Unis d'examiner de façon indépendante les données disponibles sur la toxicité de plusieurs fumigènes obscurcissant et de signalisation afin d'établir des valeurs limites d'exposition à ne pas dépasser pour chacun

d'entre eux, représentant la réglementation américaine. Il a donc été défini quatre niveaux d'expositions que sont :

- EEGL pour « Emergency Exposure Guidance Level ». EEGL représente une limite d'exposition en cas d'urgence pour une situation rare, résultant en une exposition imprévue du personnel militaire pendant moins de 24h.
- PEGL pour « Permissible Exposure Guidance Level ». PEGL représente une limite admissible d'expositions répétées du personnel militaire pendant leur entraînement.
- SPEGL pour « Short-term Public Emergency Guidance Level ». SPEGL représente une limite d'exposition de fumée à court terme de la population civile avoisinant les installations militaires (camps d'entraînement, centre de tir etc) en cas d'urgence pour une situation rare.
- PPEGL pour « Permissible Public Exposure Guidance Level ». PPEGL représente une limite admissible d'exposition de fumée possible et répété de la population civile avoisinant les installations militaires (camps d'entraînement, centre de tir etc).

Ces quatre niveaux d'expositions tiennent également compte du développement embryonnaire, de la non-altération de ses fonctions vitales ainsi que de la non-reprotoxicité. Ces valeurs pour les fumigènes à base d'HC/Zn et de RP sont regroupées dans les tableaux ci-dessous (Tableaux 7 et 8).

Ligne directrice d'exposition	Temps d'exposition	Concentration recommandée (mg/m ³) ^a	
	15 min	10	
EEGL	1 h	3	
	6 h	0,4	
PEGL	8 h/jour	0,2	
	15 min	1	
SPEGL	1 h	0,3	
	6 h	0,04	
PPEGL	8 h/jour	0,02	

 Tableau 7 : EEGL, PEGL, SPEGL et PPEGL concernant les fumigènes à base d'hexachloroéthane et d'oxyde de zinc (HC/Zn).

a comme la quantité de ZnCl₂ exprimée en mg/m³. Adapté de ¹⁹⁵

Ligne directrice d'exposition	Temps d'exposition	Concentration recommandée (mg/m ³)	
	15 min	40	
EEGL	1 h	10	
	6 h 2		
PEGL	8 h/jour 5 jours/semaine	1	
	15 min	4	
SPEGL	1 h	1	
	6 h	0,2	
PPEGL	8 h/jour 5 jours/semaine	0,1	

Tableau 8 : EEGL, PEGL, SPEGL et PPEGL concernant les fumigènes à base de phosphore rouge (RP). Adapté de ¹⁹⁵.

Ces niveaux d'expositions élaborées par le CNR peuvent être comparés à d'autres limites d'expositions utiles, tels que les valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP). La valeur limite d'exposition d'un composé chimique représente sa concentration dans l'air que peut respirer une personne pendant un temps déterminé sans risque d'altération pour sa santé. Ces valeurs sont considérées comme étant des objectifs minimaux. Ces lignes directrices sont élaborées pour les expositions professionnelles quotidiennes des travailleurs en bonne santé. Les VLEP des différents agents chimiques, y compris des particules, pour lesquels le ministère chargé du Travail a publié des valeurs limites d'exposition professionnelle, qu'elles soient indicatives, réglementaires indicatives ou réglementaires contraignantes, ont été regroupées dans l'aide-mémoire technique ED 984 (INRS. 2012)²¹².

Aux Etats-Unis, l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) publie égalemenent annuellement le fascicule : « Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices », diffusé par ACGIH, 1330 Kemper Meadow drive, Cincinnati, OH 45240-1634, États- Unis. En raison de la similitude des démarches, de l'utilisation des mêmes sources d'information scientifiques et de la proximité d'ensemble des valeurs retenues, les valeurs établies par l'ACGIH sont souvent utilisées comme un repère technique indicatif valable sur le terrain, en particulier en l'absence de valeurs limites nationales²¹².

Objectifs de l'étude :

La pollution atmosphérique, et plus particulièrement la pollution particulaire d'origine anthropique est reconnue comme un facteur de risque majeur pour la santé et est donc devenue une problématique de préoccupation croissante au niveau mondial. En effet, les particules fines en suspension dans l'atmosphère constituent l'un des facteurs de risques les plus importants impliqués dans l'augmentation croissante de la morbi-mortalité liées aux pathologies respiratoires et cardio-vasculaires induites ou exacerbées par la pollution de l'air.

Les activités pyrotechniques, que ce soit dans le domaine professionnel, civil ou militaire, sont référencées comme producteur important de particules et jouent donc un rôle non négligeable dans l'augmentation de cette pollution particulaire. Au sein du secteur militaire, de nombreux fumigènes sont utilisés lors d'opérations ou lors d'entraînements militaires, exposant le personnel militaire aux différents aérosols émis. Les conséquences sur la santé humaine de l'inhalation de ces fumigènes, représentant la principale source de particules au sein des activités pyrotechniques militaires, sont devenues une préoccupation majeure depuis une vingtaine d'années.

Par conséquent, l'objectif général de ce projet de thèse est d'apporter des connaissances sur la toxicité de particules émises lors d'activités pyrotechniques, et plus précisément de proposer des moyens d'étude de la toxicité de particules produites par diverses activités pyrotechniques, en ciblant dans cette étude l'évaluation de la toxicité des particules issues de stand de tir de petit calibre et des particules issues de la combustion de fumigènes. Ces deux familles de particules ont permis de réaliser une étude comparative sur :

1. Les moyens de prélèvements à mettre en œuvre in situ.

2. Les propriétés physico-chimiques de différents types de particules, notamment par la détermination de leur granulométrie et de leur composition en éléments inorganiques et organiques.

3. Les propriétés toxicologiques par inhalation. Pour ce dernier volet, l'approche retenue a été une évaluation de la toxicité *in vitro* en utilisant un modèle de cellules pulmonaires épithéliales en culture ainsi que l'évaluation des mécanismes impliqués dans les différentes pathologies induites par l'inhalation de particules, mécanismes que sont le stress oxydant et l'inflammation. Une étude de mutagénicité a également été effectuée à partir de particules de fumigènes.

Matériel et Méthodes

Méthodologie générale de l'étude :

L'étude de la toxicité de particules provenant d'activités pyrotechniques réalisée au cours de ce travail a été effectuée à partir de prélèvements d'échantillons collectés au sein d'un centre de tir de la base navale de Toulon (particules de tir de petits calibres) et au sein d'un centre d'expérimentation de la DGA (particules de fumigènes). Les particules de tir ont été initialement utilisées pour la mise au point de différents tests de toxicité et de conditions d'exposition utilisées ensuite pour les particules de fumigènes prélevées. Les méthodes de prélèvements utilisées lors des prélèvements de tirs ont également été mises à profit pour les prélèvements de particules de fumigènes au fur et à mesure des campagnes.

L'élaboration des méthodes de prélèvement ainsi que la caractérisation physicochimique a été réalisée en collaboration avec le Centre Commun de Mesures (CCM), Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque)

Une évaluation comparative de la toxicité des particules prélevées a été réalisée par une approche *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines. Les différents tests utilisés au cours de ce travail pour évaluer la cytotoxicité, l'inflammation, le stress oxydant et la mutagenèse sont détaillés ci-après.

I- Prélèvements

1- Présentation des campagnes de prélèvement

Plusieurs campagnes de prélèvements ont été réalisées. Deux campagnes de prélèvements de particules de tir ont été réalisées dans un stand de tir de calibre 9 mm, situé au sein de la base navale de Toulon avec l'aide du pharmacien en chef J-U MULLOT du LASEM/LCA en février 2014 et mars 2015.

Deux campagnes de prélèvements ont été réalisées à partir de fumigènes sur le site de l'armée de terre au sein du Centre d'expérimentation DGA en octobre 2014 et juin 2015. Les fumigènes prélevés ont été un fumigène coloré de signalisation (n°1) et deux fumigènes anti-intrusions (n°2 et 3) lors de la 1^{ère} campagne et un fumigène à base d'hexachloroéthane (fumigène de référence n°4) en plus des trois autres fumigènes lors de la 2^{ème} campagne de prélèvement.

2- Collecte des particules par impaction

Les différentes campagnes de prélèvement ont été effectuées en collaboration avec Dorothée DEWAELE et Fabrice CAZIER du Centre Commun de Mesures (CCM, Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque) qui dispose des moyens de prélèvements nécessaires. Les particules d'intérêt sont prélevées à l'aide d'impacteurs en cascade de type Staplex® modèle 235 (Sierra Anderson, Smyna, USA) comportant 5 étages (Figure 15).



Figure 15 : Vue globale et vue détaillée d'un impacteur en cascade et de ses 5 étages.

Pour les particules de fumigène, un filtre terminal en fibre de verre a été utilisé au niveau de l'étage 6 (« backup »).

Les impacteurs sont connectés à des pompes à haut débit (80 m³/h). L'impaction des particules sur chaque plaque (chacune étant définie par une largeur de fente) est basée sur un principe physique de mécanique des fluides : l'inertie des particules dans un flux d'air. Les poussières dans le flux d'air sont accélérées au travers d'une fente : les particules animées d'une inertie suffisante s'écartent de la trajectoire et s'impactent sur le substrat de collection (plaque métallique). Les autres particules plus fines sont dirigées vers les étages inférieurs jusqu'à ce qu'elles acquièrent la quantité de mouvement pour s'impacter. Les grosses particules sont ainsi recueillies sur la première plaque et les plus petites sur la dernière (Figure 16).



Figure 16 : Schéma du principe d'un étage d'impacteur²¹³.

Ce prélèvement permet de réaliser une ségrégation par taille de particules comprises entre 7,2 et 0,49 µm. Lors du prélèvement des particules sur les impacteurs en cascade, les particules de diamètre aérodynamique supérieur à 3 µm (PM_{>3} collectées sur l'étage 2) sont collectées séparément de celles ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 3 µm (PM₃ collectées sur les étages 3 à 6).

Pour les tirs d'arme de poing, le dispositif de prélèvement est placé sur une table à environ un mètre derrière les militaires tirant au calibre 9 mm (Figure 17). L'arme utilisée par la gendarmerie lors de leur séance de tir est l'*Universal Selbstlade Pistole* de la société allemande Heckler & Koch *« HK USP »*, un pistolet semi-automatique universel à canon court non scié.



Figure 17 : Prélèvement des particules de tir de petit calibre (9 mm) sur le site de la base navale de Toulon.
(A) Gendarme s'exerçant au tir avec une arme de poing (9 mm) (B) Deux impacteurs en cascade avec des fentes décroissantes afin de capter les différentes tailles de particules (C) Tâches noirâtres indiquant la présence de particules émises lors des tirs marquant les séparations entre les pas de tir.

Pour les tirs de fumigènes, le dispositif de prélèvement est fixé sur un mat à 2 mètres de hauteur et à environ 90 centimètres de la source d'émission des particules de fumigènes (Figure 18).



Figure 18 : Photographie du système de prélèvement utilisé lors des tirs de fumigènes. (Fumigène 1 de signalisation).

Les deux campagnes ont été réalisées dans une enceinte semi-ouverte, c'est-à-dire en présence d'un toit au-dessus des tireurs ou des fumigènes dans un local ouvert sur l'extérieur au niveau d'un de ses côtés. Une station météorologique a été utilisée pour vérifier que le vent n'interférait pas avec la dispersion du nuage dans l'enceinte. Par la suite, les impacteurs ayant servi au prélèvement sont mis à sécher sous hotte à flux laminaire pendant 24h avant la récupération des particules par grattage, étage par étage. Après grattage, les particules sont pesées et recueillies dans des flacons décontaminés et stérilisés puis congelés à -80 °C.

3- Synthèse des campagnes de prélèvements

Le tableau 9 ci-dessous résume les différentes campagnes réalisées ainsi que les quantités de particules récoltées (Tableau 9).

En général, deux jeux d'impacteurs ont été utilisés simultanément, pour des durées et des volumes de prélèvements variables (Annexe 1 et 2).

Prélèvement	Caractéristique	Dates des campagnes de prélèvement	Nombre de Tirs de fumigène par impacteur	Nombre d'impacteurs utilisés	Quantité récoltée sur les plaques en mg
Particules de Tir (PT)	Tirs de petit calibre (9 mm)	Février 2014 Mars 2015	-	2	189 517
Fumigène n°1 (F1)	Fumigène de signalisation (fumée rouge)	Octobre 2014 Juin 2015	2 tirs cumulés 2 tirs cumulés	2	748 351
Fumigène n°2 (F2)	Fumigène anti- intrusion (fumée blanche)	Octobre 2014 Juin 2015	3 tirs cumulatifs 2 tirs cumulatifs	2 2	216 30
Fumigène n°3 (F3)	Fumigène anti- intrusion (fumée blanche)	Octobre 2014 Juin 2015	3 tirs cumulatifs 2 tirs cumulatifs	2 2	1946 448
Fumigène n°4 (F4)	Fumigène à base de HC (fumée blanche)	Juin 2015	3 tirs cumulatifs	2	1663

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes campagnes de prélèvement.

Tableau résumant les quantités des différentes particules collectées sur le site de la base navale de Toulon et de la DGA (particules de tir et particules de fumigènes), ainsi que le nombre de tirs de fumigène/impacteur effectuées lors des différentes campagnes de prélèvements au cours de l'année 2014 et de l'année 2015.

II- Caractérisation physico-chimique des particules issues d'activités pyrotechniques

Les analyses physicochimiques ont été réalisées par Dorothée DEWAELE et Fabrice CAZIER Centre Commun de Mesures (CCM, Université du Littoral, Dunkerque).

1- Détermination de la granulométrie

La répartition granulométrique des particules a été mesurée d'une part par gravimétrie et d'autre part à l'aide de compteurs de particules.

a. Granulométrie par mesure pondérale

Une fois le prélèvement par impaction effectué, les particules sont collectées et pesées étage après étage. Cette technique, bien que basique, donne une assez bonne idée de la répartition en masse de particules récoltées par classe granulométrique.

b. Mesure de la concentration particulaire et de la distribution en taille de particule

Lors de la seconde campagne de prélèvement des fumigènes (juin 2015), l'analyse granulométrique des particules a également été réalisée par l'étude de la concentration particulaire (particules/cm³) et de la distribution en taille de particules (comprise entre 0,3 et 10 μ m) dans l'aérosol. Ces caractéristiques sont mesurées en temps réel pendant le prélèvement à l'aide de deux compteurs de particules (Figure 19) reliés à un ordinateur et placé à environ 2 mètres de la source d'émission de particules :

- L'analyseur OPS 3330 permet de déterminer la concentration (particules/cm³) et la distribution en taille d'aérosols compris entre 0,3 et 10 µm (répartis en 16 classes de taille), en utilisant les propriétés optiques des particules.
- L'analyseur SMPS 3910 permet de déterminer la concentration (particules/cm³) et la distribution en taille d'aérosols compris entre 10 et 400 nm (répartis en 13 classes de taille) en utilisant la mobilité électrique des particules.



Figure 19 : Photo des deux analyseurs de particules en temps réel. (A) Granulomètre pour nanoparticules SMPS NanoScan 3910 (SMPS 3910) (B) Compteur optique de particules 3330 (OPS 3330).

- 2- Détermination de la fraction inorganique des particules
- a. Analyse des composés métalliques
- Principe :

Les métaux et les éléments traces métalliques (ETM) ont été analysés par Plasma Induit Couplé à la Spectrométrie d'Emission Optique (ICP-OES, modèle ICAP 6300 DUO – Thermo).

L'ICP-OES permet l'analyse simultanée d'un grand nombre d'ETM dans diverses matrices. Pour les solides, les concentrations analysables sont situées dans une fourchette allant du ppm (mg/kg) au % en masse. Pour cela, les échantillons solides sont minéralisés sous micro-onde à l'aide d'acides purs. Après dilution et filtration, la solution obtenue est vaporisée dans le cœur d'un plasma d'argon dont la température est de l'ordre de 8000 °C. À une température aussi élevée, toutes les ETM subissent une atomisation (retour à l'état atomique de l'élément quel que soit son état initial (liaisons moléculaires, degré d'oxydation)), une ionisation et une excitation thermique. Les longueurs d'ondes émises (raies d'émission) lors du retour de l'élément à l'état fondamental (désexcitation) sont détectées à l'aide d'un spectromètre d'émission optique. Les ETM recherchés peuvent ainsi être détectés et quantifiés par mesure du signal associé aux longueurs d'ondes caractéristiques propres à chaque élément recherché (intensité de l'émission proportionnelle à la concentration).

Les métaux analysés sont les suivants : Aluminium (Al), Arsenic (As), Baryum (Ba), Calcium (Ca), Cadmium (Cd), Cobalt (Co), Chrome (Cr), Cuivre (Cu), Fer (Fe), Potassium (K), Magnésium (Mg), Manganèse (Mn), Molybdène (Mo), Nickel (Ni), Phosphore (P), Plomb (Pb), Soufre (S), Antimoine (Sb), Silicium (Si), Etain (Sn), Strontium (Sr), Titane (Ti), Vanadium (V), Tungstène (W), Zinc (Zn) et Zirconium (Zr).

Protocole :

Préparation de l'échantillon

Afin d'analyser la composition métallique, deux préparations d'échantillons sont réalisées.

Dans un premier temps, une préparation par minéralisation totale par voie humide (communément appelé digestion acide) est effectuée. La minéralisation est réalisée en réacteurs fermés dans un four à micro-ondes (digesteur Mars Xpress, CEM). Pour cela, une prise d'essai de 25 à 50 mg de particules (selon la quantité disponible) ou 1/8^{ème} de filtre quartz ou 10 cm² de back up ont été mis en présence d'acides nitrique pur (HNO₃, 5 mL) dans un réacteur en téflon. Un « blanc » constitué d'acide seul est également inclus dans chaque série de minéralisation. Les réacteurs contenant les échantillons ainsi que celui du blanc sont ensuite hermétiquement fermés puis introduits dans le digesteur. Les paramètres de minéralisation (puissance appliquée 1600 W maximum, rampe de température : montée à 180°C en 15 minutes puis pallier à 180°C pendant 20 minutes) permettent de détruire la matrice et de solubiliser totalement les divers éléments adsorbés sur les particules. Les solutions obtenues après minéralisation sont filtrées sur filtre cellulose (0,45 µm, Whatman) puis diluées avec de l'eau ultrapure à 50 mL.

Dans un second temps, une préparation par lixiviation à l'eau ultrapure de l'échantillon est réalisée afin d'obtenir la fraction soluble par mise en contact de l'échantillon avec 10 à 15 mL d'eau ultrapure suivi d'un traitement dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes et d'une filtration à 0,45 µm avant analyse.

Les solutions obtenues ainsi que les blancs analytiques et les solutions de contrôle sont analysées par l'ICP-OES.

La gamme d'étalonnage ainsi que les raies d'émission spécifiques utilisées pour la détection et le dosage de chaque élément sont présentées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 10 et 11).

Flómont	Etalon (µg/l)							
Element	A	B	С	D	E	F	G	H
Al, Ca, Fe, K, Mg	0	50	100	500	1 000	5 000	10 000	25 000
Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Si, Ti, V, Zn	0	5	10	50	100	500	1 000	2 500
Ba, Sr	0	0,5	1	5	10	50	100	250
Na	0	8	16	82	164	818	1 637	4 093
S	0	85	169	845	1 689	8 4 4 2	16 889	42 225

Tableau 10 : Gamme d'étalonnage utilisée lors de l'analyse de la composition en métaux par ICP-OES.

Elément	Raies utilisée	Visée	Plus petit standard détecté (µg/l)
Al	396,152	radiale	500
Ba	455,403	axiale	0,5
	315,887		500
Ca	317,933	radiale	100
	396,847		50
Cr	267,716	aviala	5
CI	283,563	axiale	3
Cu	324,754	axiale	5
Fa	238,204	aviala	50
re	259,940	axiale	50
K	766,490	radiala	500
N.	769,896	Taulale	500
	279,553		
Mg	280,270	radiale	50
	285,213	and the DAY.	
Mn	257,610	aviala	5
.viii	260,569	axiale	5
Mo	202,030	axiale	5
MO	203,844	axiale	5.
Na	588,592	axiale	8
Ni	231,604	axiale	5
P	178,284	axiale	50
Pb	220,353	axiale	5
S	182,034	axiale	84
C;	198,898	radiala	100
-51	251,611	Taulale	500
Sr	407,771	axiale	0,5
	190,820		10
Ti	323,452	axiale	5
	334,941		5
V	292,402	axiale	5
V	311,071		5
Zn	213,856	axiale	5

Tableau 11 : Raies utilisées pour le dosage des métaux par ICP-OES.

b. Analyse élémentaire

Principe :

L'analyse des éléments C, H, N, S, est effectuée à l'aide d'un analyseur spécifique utilisant la Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un Détecteur à conductivité thermique (Gas Chromatography–Thermal Conductivity Detector; GC-TCD) (modèle Flash 2000, Thermo Fisher Scientific).

L'échantillon placé dans une capsule d'étain est introduit dans un réacteur constitué par un tube vertical en quartz maintenu à la température de l'ordre de 1000 °C et dans lequel passe un courant d'hélium (Figure 20).



Figure 20 : Schéma simplifié de l'analyseur CHNS (GC-TCD)²¹⁴.

A l'occasion de l'introduction de l'échantillon, le courant d'hélium est automatiquement enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur (99,9995 %), provoquant ainsi la combustion éclair (flash) de la capsule et de l'échantillon. Les gaz de combustion entraînés par le courant d'hélium passent sur un catalyseur d'oxydation (oxyde de cuivre) qui les transforme en CO₂, H₂O, SO₂, SO₃, NxOy. Ces gaz passent alors sur un deuxième catalyseur (cuivre réduit) qui va réduire les oxydes d'azote en azote élémentaire, le SO₃ en SO₂ et piéger l'excès d'oxygène. A la sortie du tube, on trouve en plus du gaz vecteur hélium, les gaz N₂, SO₂, CO₂ et H₂O. Les produits non dosés sont piégés. Les gaz obtenus sont alors séparés dans une colonne de chromatographie et quantifiés par un détecteur à conductivité thermique.

Protocole :

L'appareil d'analyse élémentaire CHNS (modèle Flash 2000, Thermo Fisher Scientific) a permis de doser le carbone, l'hydrogène, l'azote et le soufre dans les échantillons de particules. Les analyses sont effectuées avec une masse d'environ 2 mg de particules placée dans la capsule en étain avec ~1 mg de vanadium pentoxyde (catalyseur du soufre). La capsule est ensuite introduite dans le four (température de 950 °C) à l'aide d'un passeur automatique. Le débit du gaz vecteur (He) est de 140 mL/min et les pressions sont de 250 kPa (He) et 220 kPa (O₂). La colonne de séparation (PTFE, 2 m, 6x5 mm) de la GC est chauffée à 70 °C. Le standard utilisé est le sulfanilamide (C₆H₈N₂O₂S) traité dans les mêmes conditions que les échantillons.

3- Détermination de la fraction organique des particules

Principe :

Les composés organiques fixés sur les particules ou constitutifs de celles-ci ont été analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS) (GC Varian modèle CP 3800, masse Varian modèle 1200MS).

Cette technique permet de séparer des molécules d'un mélange complexe. Elle s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans être dénaturés. L'échantillon injecté, est vaporisé à l'entrée de la colonne chromatographique et ses constituants sont séparés en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La ligne de transfert chauffée à 310 °C permet le passage des composés en phase gazeuse dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse où un filament chauffé (280 °C) va les ioniser grâce à un faisceau d'électrons. Un champ magnétique sépare les ions de fragmentation ainsi formés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) et les dirige vers le détecteur (Figure 21).



Figure 21 : Schéma illustrant les différentes parties de la GC-MS²¹⁴.

Le détecteur traduit l'empreinte de chaque composé sous forme de spectre masse, représentant l'abondance de chaque ion formé, suivant son rapport masse/charge. La quantification est effectuée par étalonnage externe via l'injection de standards.

Protocole :

Les échantillons ont été soumis pendant environ 16 heures à une extraction soxhlet avec du dichlorométhane (solvant) afin d'extraire les composés semi et non volatils. Le solvant a été choisi pour sa polyvalence car il permet de solubiliser un grand nombre de composés organiques. L'extrait obtenu est analysé par GC/MS (GC Varian modèle CP 3800, masse Varian modèle 1200MS).

Les échantillons de particules sont introduits dans une cartouche (cellulose) puis dans un extracteur soxhlet afin d'extraire les composés organiques. Il s'agit d'une extraction solideliquide, reposant sur le principe de la percolation d'un solvant à travers un échantillon solide contenu dans une cartouche poreuse. Le corps de l'extracteur (i.e. le soxhlet), comprenant la cartouche, est fixé sur un ballon contenant 100 mL de dichlorométhane. Le solvant est vaporisé puis condensé, et reste en contact avec le solide. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. La solution du ballon s'enrichit petit à petit en soluté et le solide est toujours mis en contact avec du solvant fraîchement distillé (Figure 22).



Figure 22 : Représentation schématique d'un extracteur soxhlet²¹⁴.

L'ébullition du solvant est effectuée pendant 16 heures et l'extrait obtenu est concentré sous flux d'azote à 2 mL et 1 μ L est injecté (split de 1:20) dans la colonne capillaire (VF-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) de la GC-MS. Les composés présents dans l'extrait injecté sont véhiculés dans la colonne chromatographique par un gaz vecteur (He). La durée d'analyse est d'une heure, la température de la source est de 280 °C et la tension de l'impact électronique est de 70 eV. Les composés ont été recherchés entre 40 et 800 unités de masse.

4- Synthèse des analyses physico-chimiques réalisées

Les différentes analyses physico-chimiques effectuées sur les différents types de particules prélevés sont résumées dans le tableau 12 ci-dessous (Tableau 12).

Analyses	Particules de Tir	Fumigènes
Granulométrie par mesure pondérale (masse de particules par classe granulométrique)	х	х
Granulométrie en temps réel (analyseurs SMPS et OPS)	-	х
Composés métalliques (ICP-OES)	х	х
Analyse élémentaire : C, H, N, S (GC-TCD)	х	х
Analyses de composés organiques (GC-MS)	-	х

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différentes analyses physico-chimiques effectuées sur les particules de tir et de fumigènes.

III- Étude toxicologique des particules issues d'activités pyrotechniques

1- Culture cellulaire

a. Modèle cellulaire

Le matériel biologique utilisé afin d'étudier la toxicité des différentes particules de tir et de fumigènes est le modèle cellulaire A549, lignée de cellules épithéliales alvéolaires qui dérive d'un carcinome pulmonaire humain. Ces cellules A549 sont commercialisées par la société LGC Standards S.A.R.L. (Molsheim, France ; référence : ATCC-CCL-185).

b. Culture des cellules A549

En fonction des paramètres d'étude considérés, la lignée A549 est ensemencée dans des microplaques de culture à 6 ou 96 puits ou encore dans des flacons de culture stériles de 75 cm². Selon les recommandations de l'ATCC et après avoir testé différentes densités cellulaires, nous avons choisi de travailler avec la densité cellulaire de 25 000 cellules/cm² ^{215,216}. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, avec des antibiotiques pénicilline (25U/ml) et streptomycine (25 µg/ml) et avec de la glutamine (2 mM) (DMEM+). Les cellules en cultures sont incubées dans des conditions de culture classique en atmosphère humide (95%) avec 5% de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C. Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Deux passages sont réalisés par semaine afin de maintenir les cellules en culture. Pour cela, les cellules adhérentes sont décollées du flacon de culture à l'aide de trypsine/EDTA (0,05%) et dénombrées sur cellules de Malassez par le test d'exclusion au Bleu Trypan. Les cellules en cultures ne doivent pas excéder 80% de confluence pour ne pas initier la différenciation cellulaire (risque potentiel de modifications physiologiques). Les cellules utilisées pour les expositions seront toujours entre leur 10^{ème} et 50^{ème} passage cellulaire.

2- Évaluation de la toxicité in vitro

La mise au point des tests de cytotoxicité sur les cellules A549 a été effectuée en utilisant le cadmium comme molécule toxique de référence. Une solution mère de chlorure de cadmium à 1mM a été préparée dans du DMEM+. Différentes études de la littérature nous ont permis de déterminer une gamme de concentration de cadmium allant de 0 à 125 µM²¹⁵. Les cellules ensemencées en plaques 6 puits ou 96 puits, prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées par les différentes concentrations de cadmium pendant 24 ou 48h selon les protocoles. La cytotoxicité a été évaluée par des méthodes complémentaires visant à étudier la perméabilité membranaire (rouge neutre) et le métabolisme mitochondrial (MTT), méthodes décrites par la suite.

a. Préparation des suspensions particulaires

Afin d'évaluer la cytotoxicité des particules, une solution mère (1 mg/mL) a été préparée dans du milieu de culture (contenant 1% de SVF et 1% de fongizone) puis celle-ci a subi une sonication (120W ; 40 kHz) de 30 min afin d'obtenir une meilleure dispersion des particules dans le milieu^{217,218} de manière à obtenir par la suite une gamme de concentration allant de 0 à 0,5 mg/mL, concentrations déterminées après une analyse bibliographique^{217,219} (Figure 23). Les tests de cytotoxicité mis au point sur les cellules A549 en utilisant le cadmium comme molécule de référence, ont ensuite été réalisés pour des temps de traitement de 24 et 48h.



Figure 23 : Photographies représentant les différentes densités de particules de tir utilisées. Les particules de tir sont à des concentrations comprises entre 0 et 0,50 mg/mL. Les cellules ont été observées au microscope optique (Axiovert 135) à un grossissement 50X et photographiées à l'aide d'une caméra Sony.

b. Évaluation de l'activité mitochondriale

> Principe :

L'évaluation de l'activité mitochondriale a été effectuée en utilisant le test de cytotoxicité MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazoliumbromide). Il est basé sur la transformation du MTT en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont ensuite solubilisés grâce à l'ajout de SDS 10% et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm grâce à un lecteur de microplaques (SAFAS Xenius, Safas, Monaco).

Protocole :

Après exposition des cellules A549 dans une plaque 96 puits, du MTT (5 mg/mL) a été ajouté à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant 3h à 37 °C à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été traitées avec une solution de lyse (SDS 10% - HCl 0,01N) afin de dissoudre les cristaux de formazan et sont incubées de nouveau 3h à 37 °C. L'absorbance a été quantifiée à 570 nm par spectrophotomètrie. La viabilité des cellules traitées a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées. Un blanc particule (milieu de culture seul contenant les particules d'intérêt) est réalisé pour chaque concentration testée afin de s'affranchir des éventuels artéfacts induits par les particules.

c. Évaluation de la perméabilité membranaire

Principe :

L'évaluation de la perméabilité membranaire a été effectuée en utilisant le test de viabilité cellulaire au rouge neutre. C'est un test de référence pour les études de toxicité, recommandé

par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) et le Centre Européen pour la Validation de Méthodes Alternatives (ECVAM). Le dosage de la capture de rouge neutre fournit une estimation quantitative du nombre de cellules viables dans une culture. Il est basé sur la capacité des cellules viables à capturer et à incorporer le colorant rouge neutre dans les lysosomes.

Protocole :

Brièvement, après l'exposition, les cellules sont incubées pendant 3h à 37°C, avec la solution de rouge neutre (3,3 mg/mL) filtrée et diluée à la concentration de 50 µg/mL dans du milieu de culture supplémenté en SVF. Le surnageant est éliminé et les cellules sont lavées avec du PBS 1X. La solution de décoloration (50% d'éthanol, 49% d'eau distillée et 1% d'acide acétique froid) est ajoutée puis les plaques sont agitées pendant 20 min. L'absorbance est lue à 544 nm en utilisant un spectrophotomètre (SAFAS Xenius, Safas, Monaco). La viabilité des cellules traitées a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées. Un blanc particule (milieu de culture seul contenant les particules d'intérêt) est réalisé pour chaque concentration testée afin de s'affranchir des éventuels artéfacts induits par les particules.

d. Évaluation des mécanismes d'exclusion membranaire

Principe :

Les mécanismes d'exclusion membranaire ont été évalués par la coloration au bleu de Trypan qui est une méthode permettant de discriminer les cellules viables des cellules mortes. Le colorant pénètre dans les cellules et induit l'activation d'un mécanisme permettant de rejeter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera le colorant et restera blanche au microscope, contrairement à une cellule morte qui restera bleue. Les cellules vivantes et mortes seront comptées manuellement au microscope optique (Olympus) et rapportées au nombre total de cellule afin d'obtenir un pourcentage. Cette méthode est couramment utilisée lors de la numération cellulaire.

Protocole :

Après 24h d'incubation dans des plaques 6 puits, les cellules A549 sont exposées aux molécules d'intérêt (cadmium, particules) pendant 24h et 48h. Après l'exposition, le milieu de culture est retiré, les cellules sont lavées 2 fois puis grattées avec du PBS 1X. La suspension cellulaire est diluée au 1/5 dans du Bleu Trypan (0,5%) pour être numérée sur cellule de Malassez. La viabilité des cellules traitées a été exprimée en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules (vivantes et mortes).

e. Évaluation du cycle cellulaire

Principe :

Le cycle cellulaire des cellules A549 exposées aux particules d'intérêt a été évalué par la technique de la cytométrie en flux. Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule. Il se définit par l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation (par division de la cellule mère) et le moment où cette cellule finit de se diviser en deux cellules filles. Il est composé de plusieurs phases de croissance dans lesquelles la cellule grossit (phase G1) et duplique son matériel génétique (phase S) et d'une phase où celle-ci se divise (mitose, phase M) pour donner naissance à deux cellules filles identiques. Les deux autres phases du cycle, G1 et G2, représentent des intervalles au cours du cycle cellulaire (G pour « Gap »). Au cours de la phase G1, la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S. Au cours de la phase G2, la cellule se prépare pour la phase M. La phase G0, quant à elle, représente une phase de quiescence, les cellules sortent du cycle cellulaire (Figure 24A).

Dans notre étude, nous avons traité les cellules A549 à l'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN, permettant de marquer et de quantifier l'ADN des cellules analysées en cytométrie en flux. Cette quantification de l'ADN permet donc de déterminer exactement la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules et de quantifier la mortalité cellulaire par la mesure de la quantité d'ADN dans une cellule. Par exemple, une cellule contenant une quantité q ADN se situera en phase G1 et une autre cellule avec une quantité 2q ADN se situera en phase G2. Une cellule ayant une quantité d'ADN supérieure à q et inférieure à 2q se situera en phase S, phase où se duplique le matériel génétique (Figure 24B).



Figure 24 : Schémas du cycle cellulaire.

(A) Présentation des différentes phases du cycle cellulaire (B) Quantités d'ADN des cellules en fonction des différentes phases du cycle cellulaire.

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (%, intensité de fluorescence, etc). Pendant l'analyse des données, différentes populations sont sélectionnées ou écartées (débris cellulaires, particules, doublets cellulaires) afin d'obtenir exclusivement les cellules exposées par nos particules dans la population représentée par les histogrammes. Un exemple d'histogramme d'un profil du cycle cellulaire d'une population de

cellules A549 est montré ci-dessous. Nous pouvons donc observer en phase sub-G0 (quantité d'ADN inférieure à q), les cellules mortes à hauteur de 10%, les cellules vivantes avec une quantité 1n ADN en phase G0-G1 à hauteur de 71%, les cellules en interphase, en phase de prolifération en phase S à hauteur de 14% et les cellules en phase de mitose en phases G2-M, avec une quantité 2n ADN à hauteur de 3% (Figure 25).



Figure 25 : Exemple d'un profil du cycle cellulaire de cellules A549.

Protocole :

Après 24h de prolifération dans des plaques 6 puits, les cellules A549 sont exposées aux molécules d'intérêt (particules) pendant 24h et 48h. Après l'exposition, le surnageant contenant les cellules flottantes est récupéré, les cellules adhérentes sont lavées au PBS 1X puis sont décollées du puits à l'aide de trypsine/EDTA (0,05%). Les cellules sont ensuite récupérées, poolées au surnageant puis centrifugées à 1500 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire est lavé avec du PBS 1X à 4°C puis les cellules sont centrifugées à nouveau à 1500 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire est récupéré dans une solution d'éthanol à 70% placé préalablement à -20°C. Les cellules sont ensuite stockées à -20°C jusqu'au marquage à l'iodure de propidium le jour de l'analyse au cytomètre en flux. Le jour de l'analyse, la suspension cellulaire au PBS 1X à 4°C est effectué. Une seconde centrifugation est effectuée puis le culot cellulaire est repris à 2 millions de cellules dans 1 mL d'une solution d'iodure de propidium, un intercalant à l'ADN (20 μg/mL), de RNase A (5 μg/mL) et triton X-

100 (1 µL/mL) afin de marquer les cellules à l'iodure de propidium. La suspension cellulaire est analysée en cytométrie en flux (FACSCanto) et les résultats sont ensuite traités sur le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

3- Évaluation des effets mutagènes

Principe :

Les effets mutagènes des particules de fumigènes ont été évalués par l'intermédiaire du test d'Ames. Le test d'Ames utilise cinq souches bactériennes de *Salmonella typhimurium* qui portent des mutations dans leur séquence d'ADN des gènes codant pour la synthèse de l'histidine, nécessaire à leur prolifération. La mutation rend donc les bactéries auxotrophes, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent se développer que dans un milieu possédant cet acide aminé, contrairement aux bactéries sauvages (prototrophes) qui poussent dans un milieu qui en est dépourvu. Ce test évalue la capacité d'une substance à induire la réversion de la mutation initiale. On cherche donc l'apparition de bactéries dites révertantes. Certains composés chimiques ayant besoin d'une activation métabolique pour induire une mutation, de l'extrait de foie de rat (appelé S9 Mix) est ajouté afin de simuler l'effet du métabolisme. Les mutations potentiellement observées après l'ajout de S9 Mix sont considérées comme des mutations indirectes.

Afin de d'assurer un niveau de réplication minimum de l'ADN nécessaire à l'établissement de la mutation réverse, les bactéries et la substance analysée sont mélangées dans de l'agar mou auquel on ajoute des quantités limitantes d'histidine. Cet agar mou est ensuite étalé à la surface de boîtes d'agar réalisées avec un milieu minimum (glucose et sels minéraux, mais sans histidine). Les boîtes sont incubées 2 à 3 jours à 37°C. Les bactéries restées auxotrophes pour l'histidine pousseront jusqu'à épuisement de l'histidine du milieu d'agar mou. Seuls les révertants, ayant retrouvé la capacité à synthétiser de l'histidine, seront ensuite capables de se développer sur ce milieu minimum. Les colonies sont ensuite dénombrées et la valeur obtenue sera comparée à un témoin afin d'estimer le pouvoir mutagène relatif de la substance vis-à-vis de chaque souche.

Protocole :

Les expériences de mutagénicité ont été réalisées par Véronique ANDRE (MCF-HDR, ToxEMAC-Caen).

Des extraits organiques ont été obtenus à partir des particules de fumigènes, en utilisant un appareil de soxhlet et 100 mL de dichlorométhane comme solvant sur 16 heures. La phase organique est soit concentrée sous un courant d'azote pour l'analyse GC-MS, soit évaporée. Le résidu sec a ensuite été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations variant de 2 à 75 µg équivalent particules/boîte pour des évaluations de potentiel mutagène.

La mutagénicité est évaluée au moyen du test d'Ames vis-à-vis des souches bactériennes TA98, YG1041, TA100, TA102 et TA97, sans et avec addition de la fraction S9mix préparée avec 5 % de S9 de foie de rat, obtenu après induction enzymatique à l'Aroclor (Moltox, Trinova Biochem, Giessen, Allemagne).

Les souches TA98, TA97 et YG1041 permettent la détection de mutations par décalage du cadre de lecture, mutation induite par des composés organiques capables de former des adduits encombrants, tels que des HAP en présence de S9 Mix pour la souche TA98 et des composés nitro-aromatiques sans S9 Mix et amino-aromatiques avec S9 Mix pour la souche YG1041. Quant à la souche TA97, elle permet la détection de mutations induites par des substances intercalantes à l'ADN. Les souches TA100 et TA102 permet la détection de mutation par substitution de paires de bases. La souche TA102 permet notamment la détection de mutations induites par des composés agissant via un stress oxydant (agents pro-oxydants) et la souche TA100 est sensible aux agents alkylants.

Le protocole utilisé intègre une période de pré-incubation d'une heure sous agitation à 37 °C de volumes réduits de réactifs (10 µL de suspension de particules, 100 µL de bouillon de *S. typhimurium* et 100 µL de S9mix ou de tampon phosphate pour les conditions sans S9mix), avant l'étalement sur les boîtes de Pétri contenant le milieu minimal sélectif des révertants²²⁰. Après 48h d'incubation à 37°C, le nombre de colonies révertantes est compté automatiquement (Logiciel Ames, Noesis, France). Pour chaque échantillon, trois concentrations sont testées (2 / 12,5 / 75 µg d'équivalent particules/boîte) en triplicat pour chaque condition, et au travers d'au moins deux expériences indépendantes. La toxicité est évaluée par l'observation au microscope de la densité de la pousse de fond bactérienne, correspondant aux bactéries restées auxotrophes pour l'histidine. Un effet mutagène est considéré significatif lorsque le nombre de révertants induits est au minimum le double du nombre de révertants spontanés, accompagné d'un effet dose.

Les Taux de Révertants Spontanés (TRS, exprimés en nombre moyen de révertants par boîte) varient selon les expérimentations et les souches :

Pour la souche TA98 : TRS de 14 \pm 6 à 18 \pm 5 sans S9mix, et de 15 \pm 7 à 16 \pm 8 pour les conditions avec S9mix ;

Pour la souche YG1041 : TRS de 59 \pm 9 à 69 \pm 17 sans S9mix, et de 28 \pm 4 à 66 \pm 19 pour les conditions avec S9mix ;

Pour la souche TA100 : TRS de 102 \pm 10 à 109 \pm 13 sans S9mix, et de 75 \pm 6 à 76 \pm 7 avec S9mix ;

Pour la souche TA102 : TRS de 216 \pm 10 à 229 \pm 7 sans S9mix, et de 194 \pm 21 à 223 \pm 7

Pour la souche TA97 : TRS de 79 \pm 11 à 80 \pm 10 sans S9mix, et de 65 \pm 8 à 80 \pm 10 pour les conditions avec S9mix.

Les composés utilisés comme témoins positifs sont :

Pour la TA98, le 2-nitrofluorène à 2,5 µg/boîte, et le 2-aminofluorène à 0,75 µg/boîte, respectivement pour les conditions sans S9mix et avec S9mix ;

Pour la YG1041, le 2-nitrofluorène à 0,5 µg/boîte et le 2-aminofluorène à 0,15 µg/boîte, respectivement pour les conditions sans S9mix et avec S9mix ;

Pour la TA100, l'azoture de sodium à 1,5 μ g/boîte pour les conditions sans S9mix ;

Pour la souche TA102, le terbutylhydroperoxyde à 2 μ mol/boîte pour les conditions sans S9mix

Pour la souche TA97, la 9-amino-acridine à 50 µg/boîte pour les conditions sans S9mix.

4- Évaluation de quelques marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation

L'étude des ARNm d'intérêt ainsi que de l'expression de leur protéine associée ont été réalisées dans le cadre du M2 de Claire ROZAY « Étude *in vitro* des mécanismes cellulaires impliqués dans les effets toxiques aigus de particules émises par les fumigènes ».

- a. Étude du niveau d'expression des ARNm d'intérêt par RT-qPCR.
- Principe :

La méthode de qPCR (PCR quantitative en temps réel), précédée d'une étape de Rétro-Transcription (RT) des ARNm contenus dans les cellules, permet la détermination du niveau d'expression de gènes codants cibles dans les cellules et la comparaison de ces niveaux entre les cellules exposées ou non. La RT-qPCR permet donc de quantifier l'ARNm d'intérêt initialement présent dans un échantillon et de connaître le niveau d'expression d'un gène codant dans une condition donnée. Cette méthode comprend plusieurs étapes permettant successivement :

- l'extraction des ARN
- la rétro-transcription des ARNm en ADN complémentaire (ADNc) (RT)
- l'amplification et la quantification des ADNc (qPCR).

Protocole :

1) <u>Récupération des cellules :</u>

Une fois les cellules exposées 6h et 24h à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1, trois puits par condition sont utilisés afin de réaliser l'étude du niveau d'expression des ARNm d'intérêt. Les cellules adhérentes sont grattées et récupérées après rinçage dans du PBS 1X

à froid (4°C). Une centrifugation à 4°C, à 1500 rpm pendant 15 minutes est effectuée avant de congeler l'échantillon dans l'azote liquide et de le conserver à -80°C.

2) Extraction de l'ARN au TRI Reagent ® :

Les cellules sont homogénéisées dans du TRI Reagent ® (Sigma-Aldrich) puis incubées pendant 5 minutes à température ambiante. L'ARN est ensuite séparé de l'ADN et des protéines par ajout de chloroforme et centrifugation à 12 000g. Le surnageant contenant les ARN est récupéré et de l'acide isopropylique est ajouté afin de précipiter l'ARN. Le surnageant est enlevé et l'ARN lavé à l'éthanol pour éliminer les traces éventuelles de chloroforme. Pour finir, l'éthanol est évaporé par séchage du culot à l'air libre et ce dernier est reprit avec de l'eau dépourvue de RNAse.

3) Dosage des ARNs

Le dosage des ARNs se fait avec le bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Il s'agit d'une électrophorèse miniaturisée permettant la migration des ARN en fonction de leur taille, ARN préalablement marqués par des molécules fluorescentes. La fluorescence est ensuite mesurée et comparée à celle d'un marqueur de taille. Ce dosage renseigne sur la concentration d'ARN dans l'échantillon mais aussi sur la qualité des ARNs obtenus. Les ARNs sont considérés comme étant de bonne qualité lorsque le RIN (RNA integrity number), permettant l'estimation de la dégradation des ARN, est supérieur à 9.

4) Traitement à la DNAse :

Pour éliminer toute trace d'ADN avant la rétro-transcription, les échantillons sont traités à la Dnase I (Dnase I, Amplification Grade, Thermo Fisher Scientific) selon un protocole défini par le laboratoire et par le fournisseur.

5) Rétro-transcription des ARNm :

Des oligonucléotides, de la reverse transcriptase, un inhibiteur de Rnase et des bases nucléiques sont ajoutés à 0,09 µg d'ARN dans les quantités recommandées par le fabricant, rendant possible sa rétrotranscription en ADNc (AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent Technologies). L'ensemble est incubé à 25°C pendant 5 min pour hybrider les amorces (oligodT), puis à 42°C pendant 15 min pour synthétiser l'ADNc pour enfin être incubé à 95°C pendant 5 min finalisant l'hybridation.

6) PCR en temps réel :

Pour réaliser les PCR en temps réel, le SYBR Green, un agent fluorescent et intercalant de l'ADN double brin, est utilisé. Du fait de la fluorescence émise par le SYBR Green intercalé au sein de l'ADN double brin, l'amplification de la quantité d'ADN au cours de la PCR peut être enregistrée. Dans cette phase, l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la

quantité initiale de matrice (ADNc). Ainsi, les quantités d'ADN peuvent être comparées entre deux échantillons (quantification relative).

Les amorces sens (FOR) et anti-sens (REV), le tampon (Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mix, Agilent Technologies) contenant notamment la TAQ polymérase, les nucléotides, le SYBR Green et un contrôle interne sont ajoutés aux ADNc selon les recommandations du fournisseur.

Gènes étudiés :

Les gènes étudiés dans notre étude sont la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn) et cytosolique (SOD CuZn), la catalase et l'hème oxygénase 1 (HO-1) en ce qui concerne la partie stress oxydant et l'interleukine 6 et 8 (IL-6 et IL-8) pour la partie inflammation. Les caractéristiques des amorces sens (FOR) et anti-sens (REV) (Eurogentec) spécifiques de ces gènes ainsi que la taille de l'amplicon et la température d'hybridation sont décrites dans le tableau 13 (Tableau 13). Afin d'étudier l'expression d'un gène cible à partir d'échantillons différents, il est nécessaire de réaliser en même temps l'amplification de gènes de référence dont l'expression est constitutive comme par exemple la β -actine et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Nom des amorces	Sequence (5'→ 3')	Taille de l'amplicon (pb)	T° hybridation
SOD CuZn For	GGG-CAA-TGT-GAC-TGC-TGA-C	197	60
SOD CuZn Rev	ACA-AGC-CAA-ACG-ACT-TCC-AG	107	50
SOD Mn For	CCT-GGA-ACC-TCA-CAT-CAA-CG	110	60
SOD Mn Rev	CCA-ACG-CCT-CCT-GGT-ACT-TC	110	60
Catalase For	GCC-TTT-GGC-TAC-TTT-GAG-GTC	101	60
Catalase Rev	GAG-AAC-CGA-ACT-GCG-ATG-G	101	
HO-1 For	TTC-TCC-GAT-GGG-TCC-TTA-CAC	140	60
HO-1 Rev	GGC-ATA-AAG-CCC-TAC-AGC-AAC-T	145	
IL-8 For	AAG-AAA-CCA-CCG-GAA-GGA-AC	183	60
IL-8 Rev	AAA-TTT-GGG-GTG-GAA-AGG-TT	105	00
IL-6 For	ACC-CCT-GAC-CCA-ACC-ACA-AAT	07	60
IL-6 Rev	AGC-TGC-GCA-GAA-TGA-GAT-GAG-TT	37	00
Bêta-Actine For	GAT-CAT-TGC-TCC-TCC-TGA-GC	101	60
Bêta-Actine Rev	ACT-CCT-GCT-TGC-TGA-TCC-AC	101	60
GAPDH For	GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-GTC-GT	185	60
GAPDH Rev	GAC-AAG-CTT-CCC-GTT-CTC-AG	100	

 Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées pour l'évaluation du stress oxydant et de l'inflammation, taille de l'amplicon obtenu et température d'hybridation utilisée pour réaliser la qPCR.

Profil thermique :

Les ADNc sont soumis à des variations de température permettant leur réplication (Figure 26). Dans un premier temps, la température est augmentée jusque 95°C pendant 3 minutes
permettant une bonne dénaturation initiale. Par la suite, les cycles de PCR se divisant en deux phases selon les recommandations du fournisseur :

- une première phase à 95 °C pendant 10 sec où l'ADN est dénaturé
- une deuxième phase à 60°C pendant 20 sec permettant l'hybridation et l'élongation des amorces.

Ces deux phases sont répétées 40 fois puis un programme de dissociation se met en place, permettant de contrôler la spécificité de la PCR par le biais de trois phases :

- une première phase à 95°C pendant 1 min qui va permettre la dénaturation des brins d'ADNc
- une deuxième phase à 55°C pendant 1 min qui va permettre la ré-hybridation des brins d'ADNc



- une troisième phase à 95 °C pendant 30 sec.

Figure 26 : Schéma représentant le profil de température utilisé lors de la PCR.

Pour chaque PCR, une gamme étalon d'ADNc est réalisée ainsi que des contrôles afin de s'assurer de l'absence d'ADN contaminant. La gamme d'ADNc permet d'obtenir l'efficacité de la PCR pour chaque gène étudié. En effet, à chaque dilution d'ADNc correspondra un nombre de cycles pour lequel le signal de fluorescence sera supérieur au signal de bruit de fond (Cp) et sera inversement proportionnel à la quantité d'ADNc initiale.

Analyse des données :

Après validation de l'efficacité (E) et de la spécificité de chaque PCR, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le Cp pour le gène de référence (R) et pour le gène cible (C) est analysé. Les résultats ont été interprétés uniquement lorsque les efficacités des PCR étaient

comprises entre 90 et 110%. Une fois ces conditions réunies, il est alors possible de savoir si l'expression du gène cible est modifiée en calculant le rapport entre l'expression du gène dans le témoin (T) et l'échantillon (X) (quantification relative) par la formule :

$$R = E_C^{Cp_{C,T}-Cp_{C,X}} * E_R^{Cp_{R,X}-Cp_{R,T}}$$

b. Étude du niveau d'expression de la protéine anti-oxydantes Mn-SOD par western blot > Principe :

Le western blot est une technique permettant la détection de protéines d'intérêt après séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon le poids moléculaire et transfert sur membrane. L'immunomarquage permet donc la mise en évidence d'une ou plusieurs protéines par la méthode de chimiluminescence, l'une des méthodes de détection les plus sensibles. L'anticorps primaire se fixe sur la protéine d'intérêt et l'anticorps secondaire, généralement lié à une enzyme permettant l'identification visuelle de la protéine étudiée sur la membrane, se fixe spécifiquement sur le premier anticorps afin d'amplifier la détection. L'enzyme est utilisé en conjonction avec un agent luminescent, et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration de la protéine d'intérêt

Protocole :

1) Récupération des cellules :

Une fois les cellules exposées 24h à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules du fumigène 1, deux puits d'une plaque 6 puits sont utilisés par condition pour réaliser les western blots. Le milieu de culture est éliminé, les cellules sont récupérées en utilisant de la trypsine/EDTA 0,05% et les puits sont ensuite rincés avec du PBS 1X. Le tout est centrifugé pendant 10 minutes à 1500 rpm, le surnageant est retiré et les cellules sont congelées dans de l'azote liquide puis conservées au congélateur à -80°C.

2) Extraction des protéines :

Les protéines sont extraites par du tampon RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay, Sigma-Aldrich). Des inhibiteurs de protéases (Halt[™] Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific) sont ajoutés afin d'éviter la destruction des protéines. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Bradford²²¹ en utilisant la BSA pour la réalisation de la gamme étalon (de 0 à 0,5 mg/mL). Le réactif de Bradford développe, en présence des protéines, une coloration bleue quantifiable à 595 nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Apres incubation des échantillons pendant 10 minutes à température ambiante en présence du réactif de Bradford (BioRad, France) dilué au 1/5, la lecture est réalisée sur lecteur de microplaque (SAFAS Xenius, Safas, Monaco).

3) Western blot :

Les extraits protéiques sont dilués dans de l'eau de manière à avoir 15 µg de protéines dans 15 µL, et un tampon de charge (NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X, Thermo Fisher Scientific) est ajouté. Dans un second temps, les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes.

La migration se fait sur des gels de polyacrylamide à gradient 4-12% (NuPAGE[™] Novex[™] 4-12% Bis-Tris Protein gels, Thermo Fisher Scientific) dans du tampon de migration MES (acide 2-morpholino-ethane sulfonique monohydrate 45 mM, trisbase 50 mM, EDTA 4 mM, sodium dodecyl sulfate 3,5 mM) pendant 45 minutes à une tension constante de 200V à l'aide du système « XCell SureLock Mini-Cell » (Thermo Fisher Scientific).

La membrane de nitrocellulose (porosité : 0,45µM) et le gel sont équilibrés dans un tampon de transfert (transblot ® turboTM (20%), eau (60%) et éthanol (20%)) avant le transfert des protéines vers la membrane. Le transfert se fait via un appareil Trans-Blot Turbo ® (Bio-Rad) pendant 10min (1,5 à 2,5A, jusqu'à 25V). Le gel est ensuite coloré avec du bleu de Coomassie (coomassie blue R-2500 3mM ; méthanol 40%, acide acétique 7%) et la membrane est immergée dans du tampon de blocage (albumine sérique bovine 5% ou lait 5% en fonction des anticorps primaires, Tris Base 50mM, NaCl 150mM, tween 0,1%) pendant 3h pour bloquer les sites non spécifiques de la membrane où l'anticorps primaire pourrait se lier. La membrane est exposée à l'anticorps primaire anti-MnSOD (SOD (Mn) Antibody (OASE00357), Aviva systems biology) dilué au 1/1000 dans le tampon de blocage pendant toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est rincée avec du tampon de lavage (Tris Base 50mM, NaCl 150mM, tween 0,1%) puis exposée à l'anticorps secondaire (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch laboratorie, INC) dilué au 1/8000 dans du tampon de blocage. En parallèle, l'expression de protéines constitutives (β -actine ou GAPDH) est mesurée. Pour cela, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires anti-βactine et anti-GAPDH (Monoclonal Anti-β-Actin Clone AC-15 dilué au 1/5000, Sigma-Aldrich et GAPDH (14C10) Rabbit mAb, Cell Signaling technology ® dilué au 1/1000) puis avec les anticorps secondaires anti-lapin pour la GAPDH et anti-souris pour la β-actine (Peroxidaseconjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), dilué au 1/8000, Jackson ImmunoResearch laboratorie, INC).

Après lavage avec du tampon (Tris base 0,05M, NaCl 0,15M, Tween 10%), la révélation des protéines d'intérêt se fait après immersion de la membrane pendant 5 minutes dans une solution de chimiluminescence (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) par l'appareil Fusion FX 5 doté d'une caméra (Vilber Lourmat).

Les western blots pour les échantillons exposés aux particules de fumigène ont été réalisés à partir d'au moins 3 expériences indépendantes, pour ces échantillons les résultats seront exprimés comme suit :



5- Expositions à l'interface « pseudo air-liquide » (ALI)

> Principe :

Lors de l'évaluation des différents effets biologiques dus à l'exposition des cellules A549 aux particules de tir et de fumigènes, la principale difficulté est de reproduire les conditions expérimentales d'expositions les plus proches de la physiologie humaine lors d'une inhalation de particules. Afin de répondre à cette problématique, les cellules A549 ont été exposées à l'interface air-liquide (ALI) par l'intermédiaire d'un prototype de nébulisation d'aérosols liquides (VITROCELL® Cloud ALI Starter Kit) (Figure 27).



Figure 27 : Schéma explicatif de l'exposition de cellules à l'interface air-liquide.

Les cellules A549 (B) sont cultivées sur inserts poreux permettant le contact du pôle basal des cellules A549 avec le milieu de culture (C) afin d'assurer le maintien des conditions vitales et l'exposition du pôle apical à différentes phases gazeuses, semi-volatiles ou encore particulaires.

Le module de base du prototype de nébulisation est réalisé en acier inoxydable, où se situe l'insert contenant les cellules A549, et thermostatées à une température constante de 37°C. La chambre d'exposition est réalisée en polycarbonate et au-dessus se positionne le système de nébulisation permettant l'évaporation de la matière, exposant les cellules sur leur pôle apical (Figure 28).



Figure 28 : Photo du système d'exposition VITROCELL® Cloud ALI Starter Kit.

Les cellules A549 sont exposées à l'interface air-liquide pendant le temps de la nébulisation, c'est-à-dire environ 30 min (répétition de nébulisation de 200 µL de solution particulaire), puis du milieu de culture est ajouté et les cellules sont remises à 37°C pour une phase d'exposition en mode immergé pendant 24h, protocole que nous nommerons « méthode pseudo-ALI » (Figure 29).



Figure 29 : Schéma du système d'exposition VITROCELL® Cloud ALI 6 puits.

200 µL de solution particulaire sont placées dans le nébuliseur afin d'être nébulisés en un nuage de fumée particulaire dans la chambre d'exposition. Au bout de 3 à 5 min, les particules issues de la nébulisation sédimentent sur le module de base ainsi que sur les inserts où sont situées les cellules A549, exposées à l'interface air-liquide.

Protocole :

Afin d'exposer les cellules A549 à l'interface air-liquide, ces dernières sont mises à incubés sur inserts poreux à une densité cellulaire de 25 000 cellules/cm² pendant 24h à 37°C afin d'obtenir un tapis confluant à hauteur d'environ 80%. Le milieu de culture est ensuite retiré des inserts et ce dernier est placé dans la chambre d'exposition contenant du milieu de culture au pôle basal des cellules.

Dans le but d'exposer les cellules A549 aux particules à des concentrations estimées de 0,030 mg/cm² et 0,075 mg/cm² (concentrations identiques à celles utilisées lors de la méthode d'exposition en mode immergé pour les particules de fumigènes, correspondant respectivement à 0,1 mg/mL et 0,25 mg/mL), 200 µL d'une solution mère de particules diluées dans du milieu de culture complémenté avec 1% de SVF, à 1,36 mg/mL et 3,4 mg/mL sont nébulisés afin d'exposer le tapis cellulaire situé à l'interface air/liquide. Cette opération est répétée dix fois afin d'atteindre les concentrations d'expositions estimées de 0,030 mg/cm² et 0,075 mg/cm². Après 30 min d'exposition en mode ALI, du milieu de culture 1% SVF est ajouté sur les cellules, puis elles sont placées 24h à 37°C pour une phase de récupération mimant le temps de rétention d'une particule au contact de l'épithélium alvéolaire avant son élimination par le système immunitaire (24h à 48h). La viabilité cellulaire a été évaluée par le test au Bleu Trypan décrit précédemment. La viabilité des cellules traitées a été exprimée en pourcentage de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules. L'exposition de cellules A549 par la méthode d'exposition à l'interface ALI à du milieu de culture sans particules a également été effectuée dans les mêmes conditions d'expositions que les cellules exposées aux particules afin de s'assurer de la non cytotoxicité de cette méthode d'exposition.

6- Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type. Dans toutes les expériences, « n » indique le nombre de cultures indépendantes à partir desquelles les mesures ont été effectuées, avec un nombre de réplica minimum de 3. Le logiciel GraphPad a été utilisé pour l'analyse statistique des résultats. Afin de comparer deux groupes indépendants, des tests de Student ont été réalisés. Pour les comparaisons multiples, des analyses univariées (ANOVA) ont été utilisées, suivies d'un test de Tukey. Les valeurs de p<0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

Résultats et Discussion

Ce chapitre se compose de deux études distinctes. Pour ces deux parties, après avoir exposé les conditions dans lesquelles les prélèvements de particules ont été menés, nous nous intéresserons à la caractérisation physico-chimique. Nous aborderons également les résultats de l'étude toxicologique de ces particules, portant sur l'impact *in vitro* des échantillons collectés sur une lignée cellulaire épithéliale alvéolaire humaine (A549). L'attention a ensuite été portée sur la capacité des particules à modifier le déroulement du cycle cellulaire, à induire aussi bien un stress oxydant ; par la mesure de l'expression des ARNm de la catalase, la superoxyde dismutase et l'hème oxygénase-1 ; qu'une réponse inflammatoire, par l'étude de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8. Une étude de mutagénicité a également été effectuée à partir des particules de fumigènes. Pour chacune de ces deux parties, nous nous intéresserons également au mode d'exposition en comparant les résultats de cytotoxicité obtenus après une exposition dite « en immergée » et après une exposition dite « à l'interface air – liquide » (ALI) ou plus précisément « pseudo-ALI ».

Étude 1 : Caractérisation physico-chimique et analyse toxicologique des particules de tir d'armes à feu de petit calibre (9 mm).

I- Campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des particules de tir de petit calibre.

1- Granulométrie par mesure pondérale

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux effets de particules émises lors de tirs d'armes de poing de petit calibre (9 mm) utilisées par la gendarmerie nationale.

Ces particules ont été récupérées lors de deux campagnes de prélèvements dans un stand de tir, situé à la base navale de Toulon en présence du pharmacien en chef J-U MULLOT du LASEM/LCA en février 2014 et mars 2015. Rappelons que le dispositif de prélèvement est placé sur une table à environ un mètre derrière les militaires tirant au calibre 9 mm dans une enceinte semi-ouverte.

Lors de la première campagne de prélèvement, 189 mg de particules ont été collectées et 518 mg lors de la deuxième campagne (Annexe 1). Le dispositif d'impaction en cascade utilisé dans cette étude présente un diamètre de coupure de 0,49 μ m sur l'avant dernière plaque, ce qui signifie que les particules les plus fines (<0,3 μ m : diamètre de coupure de la dernière plaque) ne sont pas retenues. Comme le montre la figure 29, les particules prélevées ont un diamètre aérodynamique compris entre 7,2 μ m et 0,49 μ m de diamètre (limite de prélèvement) avec une proportion de plus de 75% des particules de taille supérieure à 3 μ m (taille comprise entre 3 et 7,2 μ m) (Figure 30).





Les particules de différentes tailles ont été récoltées sur différentes plaques d'impactions permettant une séparation selon un diamètre aérodynamique décroissant.

Le tableau 14 ci-dessous présente de façon détaillée les données issues de l'échantillonnage des particules de taille supérieure ou inférieure à 3 μ m (PM₃ et PM_{>3}), ainsi que leur concentration dans l'air après plusieurs sessions d'exercices sur pas de tir (Tableau 14).

Type de particules	РМ	Masse collectée (mg)	Durée de prélèvement (h)	Débit	Volume pompé (m³)	Concentration PM Air (µg/m³)
Particules de	PM _{>3}	514,6	15,54	2 x 80 m³/h	2486,6	206,9
tir de 9 mm	PM _{<3}	191,5				77,0

Tableau 14 : Ensemble des données de prélèvements et concentrations des particules de tir.

2- Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire C, H, N, S a été effectuée pour les particules de tir (Figure 31).



Figure 31 : Analyse élémentaire C,H,N,S des particules issues des deux campagnes de prélèvements de tir de petit calibre (9 mm) (2014 et 2015). Les données sont exprimées en % de l'échantillon ± écart-types (n=2).

Ces particules sont très peu carbonées car seuls environ 4% de C ont été retrouvés. Les teneurs en hydrogène, en azote et en soufre restent également assez faibles (H=0,6%, N=0,2% et S=0,05%). Ces résultats montrent sans surprise qu'il y a peu de matière organique.

Les analyses par ICP-OES ont été entreprises de façon à déterminer les teneurs globales en métaux présents dans les particules issues de la campagne de 2014. Ces analyses montrent que des éléments métalliques ont été détectés avec comme élément majoritaire le plomb (Pb) à hauteur de 4,6%, puis le calcium (Ca) 1,8%, le baryum (Ba) 0,8%, l'aluminium (Al) 0,6% et le fer (Fe) 0,3% ainsi que dans une moindre proportion le potassium (K) avec une teneur de 0,17% et du cuivre à hauteur de 0,11% (Tableau 15).

Eléments	mg/kg	%
Al	6 270	0,6
Ba	8 100	0,8
Ca	18 000	1,8
Cr	16	0
Cu	1 082	0,1
Fe	3 333	0,3
K	1 758	0,2
Mg	926	0
Mn	38	0
Мо	<20	0
Na	509	0
Ni	<20	0
Р	174	0
Pb	46 474	4,6
S	1 119	0,1
Si	1 010	0,1
Sr	93	0
Ti	63	0
V	<20	0
Zn	327	0

Tableau 15 : Composition en métaux (ICP-OES) des particules issues de tir de petit calibre (9 mm) en mg/kg
(campagne 2014).

Les particules issues de la deuxième campagne de prélèvement ont été analysées par le laboratoire COBRA par la même technique qu'est l'ICP-OES. Comme pour la campagne de 2014, le composé majoritaire est le plomb à hauteur de 23% suivi du calcium (3%), du cuivre (1,5%), du zinc (1,2%), du baryum (1,1%) et de l'antimoine (0,8%) (Tableau 16). Pour cette seconde campagne de prélèvement, les concentrations des différents métaux restent similaires aux résultats obtenus lors de la première campagne sauf pour le Pb, qui voit sa teneur passer de 4,6% à 23%.

Eléments	mg/kg	%
Ag	<6	0
Al	9 065	0,9
As	16	0
Ba	11 335	1,1
Be	<1	0
Bi	35	0
Ca	30 490	3
Cd	<1	0
Со	<10	0
Cr	34	0
Cu	14 627	1,5
Fe	5 923	0,6
Ga	<1	0
In	<10	0
K	6 754	0,7
Li	<10	0
Mg	1 838	0,1
Mn	78	0
Мо	<10	0
Na	1 147	0,1
Ni	<1	0
Р	<21	0
Pb	228 780	22,8
S	40	0
Sb	8 007	0,8
Sr	94	0
Ti	7 378	0,7
V	<20	0
Zn	12 112	1,2

Tableau 16 : Composition en métaux (ICP-OES) des particules issues de tir de petit calibre (9 mm) en mg/kg (campagne 2015). Composition déterminée par le laboratoire COBRA.

II- Analyse toxicologique des particules de tir de petit calibre après exposition en mode immergé.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réalisé des mises au point de tests de cytotoxicité en utilisant le chlorure de cadmium comme molécule toxique de référence en présence de 10% de SVF (condition standard des cultures de cellules A549). En ce qui concerne l'exposition aux particules de tir, nous avons effectué une étude comparative en fonction du pourcentage de SVF utilisé (10 et 1%), suite aux observations réalisées au laboratoire et aux résultats de la littérature^{218,219}.

1- Étude de la cytotoxicité de chlorure de cadmium (CdCl₂)

a. Évaluation de l'activité mitochondriale (MTT)

Les cellules A549 sont traitées avec une solution de chlorure de cadmium pendant leur phase exponentielle de croissance, soit 24h après avoir été ensemencées. L'effet du chlorure de cadmium sur la prolifération cellulaire a été évalué après 24h et 48h d'exposition à des concentrations croissantes (0 - 125 μ M) par le test MTT permettant d'évaluer l'activité mitochondriale cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules non traitées (cellules incubées avec du DMEM contenant 10% de SVF). Une cytotoxicité au chlorure de cadmium a été observée avec une diminution de la viabilité cellulaire de plus de 3 fois (3,2) à 24h et de 5 fois à 48h pour la concentration de chlorure de cadmium la plus élevée (125 μ M). On observe des différences significatives à chaque doublement de concentration après 24h d'exposition, entre 25 et 50 μ M ainsi qu'entre 50 et 100 μ M (Figure 32). Les concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀) pour ces temps d'expositions ont été atteintes respectivement pour des concentrations de 85,7 et 32,6 μ M de chlorure de cadmium. Ces valeurs sont en accord avec les IC₅₀ retrouvées dans la littérature^{215,216}.



Figure 32 : Cytotoxicité (Test MTT) du chlorure de cadmium (0 - 125 μM) sur cellules A549 (milieu de culture à 10% de SVF).

La cytotoxicité du CdCl₂ a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 10% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

b. Évaluation de la perméabilité membranaire (Rouge Neutre)

La perméabilité membranaire a été évaluée par la suite grâce à la technique de capture du rouge neutre, test de référence pour les études de toxicité²¹⁵. Après 24h et 48h d'exposition à des concentrations croissantes de chlorure de cadmium (0 - 125 μ M) avec 10% de SVF, la cytotoxicité des cellules A549 est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées. Une cytotoxicité au chlorure de cadmium a été observée à 24h dès 50 μ M et à 48h dès 25 μ M (Figure 33). Nous avons évalué l'IC₅₀ à 48,6 et 34,4 μ M respectivement pour 24 et 48h d'exposition, valeurs en accord avec celles retrouvées dans la littérature^{215,216}.



Figure 33 : Cytotoxicité (Test Rouge Neutre) du chlorure de cadmium (0 - 125 μM) sur cellules A549 (milieu de culture à 10% de SVF).

c. Évaluation des mécanismes d'exclusion membranaire (Bleu Trypan)

Les mécanismes d'exclusion membranaire ont été évalués grâce au test au Bleu Trypan avec du milieu de culture complémenté avec 10% de SVF. Après 24h d'exposition au CdCl₂ à des concentrations de 40 et 75 μ M, la cytotoxicité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées. Cette exposition a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire à la concentration de 75 μ M (Figure 34).

La cytotoxicité du CdCl₂ a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 10% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.



Figure 34 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) du chlorure de cadmium (0 - 75 μM) sur cellules A549 (milieu de culture à 10% de SVF).

La cytotoxicité du chlorure de cadmium a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 10% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=2). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01.

2- Etude de la cytotoxicité des particules de tir : influence du SVF

a. Influence du pourcentage de SVF (1% et 10%) sur la prolifération des cellules A549

Afin de pouvoir utiliser seulement 1% de SVF dans notre milieu de culture, nous nous sommes assurés que les cellules A549 ne subissaient aucune modification de prolifération avec ce milieu de culture faiblement concentré en SVF.

Nous avons donc évalué les effets du SVF sur la prolifération des cellules A549 à l'aide du test MTT, permettant l'évaluation de l'activité mitochondriale. Nous n'avons observé aucune différence significative de la prolifération cellulaire après 24h et 48h de culture en milieu complémenté à 10% ou 1% de SVF (Figure 35).



Figure 35 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur la viabilité (MTT) des cellules A549. Les cellules A549 sont incubées avec un milieu de culture à 10% et 1% de SVF pendant 24h (A) et 48h (B). La viabilité cellulaire a été évaluée par le test MTT et les données sont exprimées en moyennes ± écart-types (n=4). Témoin 10% SVF vs témoin 1% SVF. Nous nous sommes également intéressés aux effets du SVF sur la viabilité cellulaire par l'intermédiaire du test Bleu Trypan et ici aussi, nous n'avons pas observé de différence significative avec l'utilisation de milieu de culture complémenté à 10% ou 1% de SVF à 24h et 48h (Figure 36).



Figure 36 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur la viabilité (Bleu Trypan) des cellules A549. Les cellules A549 sont incubées avec un milieu de culture à 10% et 1% de SVF pendant 24 (A) et 48h (B). La viabilité a été évaluée par le test Bleu Trypan et les données sont exprimées en nombre moyen de cellules vivantes ± écart-type (n=3). Témoin 10% SVF vs témoin 1% SVF.

L'étude de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a également été réalisée dans ces deux mêmes conditions de culture et les résultats ne montrent aucune différence entre les conditions quel que soit le temps étudié (Figure 37).





Figure 37 : Effet du sérum de veau fœtal (1% et 10% SVF) sur les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549.

Les cellules A549 sont incubées avec un milieu de culture à 10% et 1% de SVF pendant 24h (A, B, C, D) et 48h (E, F, G, H). Les différentes phases du cycle cellulaire, que sont les phases sub-G0 (A et E), G0-G1 (B et F), S (C et G) et G2-M (D et H), sont identifiées grâce à la technique de la cytométrie en flux et les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules ± écart-type (n=3). Témoin 10% SVF vs témoin 1% SVF.

À la vue de ces informations, nous avons montré que la culture en 1% de SVF n'altère pas la prolifération cellulaire ni la distribution des cellules dans le cycle cellulaire.

b. Évaluation de l'activité mitochondriale (MTT)

L'évaluation de l'activité mitochondriale cellulaire par le test de viabilité MTT a, par la suite, été effectuée sur les cellules A549 après 24h et 48h d'exposition à des concentrations croissantes de particules de tir (0 - 0,5 mg/mL) dans du milieu de culture complémenté avec 1% et 10% de SVF. Après 24h et 48h d'exposition à des particules de tir avec un milieu de culture à 10% de SVF, il n'a pas été possible de déterminer une IC₅₀, puisque seule une diminution de la viabilité cellulaire de 1,33 fois à 24h et 1,47 fois à 48h à la concentration la plus élevée de particules de tir (0,50 mg/mL) a été observée (Figure 38).



Figure 38 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de tir (0 - 0,50 mg/mL) sur cellules A549 (milieu de culture à 10% de SVF).

En milieu contenant 1% de SVF, nous observons une baisse de l'activité mitochondriale dès 0,05 mg/mL avec une diminution de la viabilité cellulaire de 1,69 fois et 1,30 fois respectivement à 24 et 48h. On observe une diminution de la viabilité cellulaire beaucoup plus élevée en ce qui concerne la concentration la plus élevée de 0,50 mg/mL, représentant une diminution de 2,22 fois à 24h et de 2,56 fois à 48h. Les IC₅₀ pour 24 et 48h d'exposition ont été atteintes respectivement pour des concentrations de 0,34 et 1,03 mg/mL de particules de tir (Figure 39).



Figure 39 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de tir (0 - 0,50 mg/mL) sur cellules A549 (milieu de culture à 1% de SVF).

La cytotoxicité des particules de tir a été évaluée après 24h (Å) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 1% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=4). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

La cytotoxicité des particules de tir a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 10% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=4). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01.

c. Évaluation de la perméabilité membranaire (Rouge Neutre)

Concernant les résultats de ce test pour l'étude de l'effet des particules, nous avons observé de fortes interférences des particules encore présentes dans les puits malgré les différents lavages ce qui explique l'augmentation des absorbances en fonction de l'augmentation de la concentration en particules (Figure 40). Nous avons par conséquent décidé de ne pas retenir ce test lors de l'étude de la cytotoxicité des particules de fumigènes.



Figure 40 : Cytotoxicité (Test Rouge Neutre) des particules de tir (0 - 0,5 mg/mL) sur cellules A549 (milieu de culture à 1% de SVF).

La cytotoxicité des particules de tir a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 1% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3).

d. Évaluation des mécanismes d'exclusion membranaire (Bleu Trypan)

Nous avons évalué les mécanismes d'exclusion membranaire grâce au test au Bleu Trypan avec du milieu de culture complémenté avec 10 et 1% de SVF. Après 24h et 48h d'exposition aux particules de tir à des concentrations croissantes de 0,05 et 0,1 mg/mL, la cytotoxicité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées. En présence de 10% de SVF, cette exposition n'a entraîné qu'une faible diminution de la viabilité cellulaire à 24h à la concentration de 0,1 mg/mL ainsi qu'une diminution significative aux concentrations 0,05 mg/mL et 0,1 mg/mL à 48h (Figure 41A et B). *A contrario*, en présence de 1% de SVF nous avons observé une diminution significative de la viabilité cellulaire à 24 et 48h pour les concentrations de 0,05 et 0,1 mg/mL (Figure 41C et D).



Figure 41 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de tir (0 - 0,1 mg/mL) sur cellules A549 (milieu de culture à 10% et 1% de SVF).

La cytotoxicité des particules de tir a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition dans du milieu de culture à 10% de SVF et après 24h (C) et 48h (D) d'exposition dans du milieu de culture à 1% de SVF. Les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

e. Évaluation du cycle cellulaire

Afin de compléter et d'appuyer les résultats de cytotoxicité, nous nous sommes intéressés au cycle cellulaire qui nous permet d'observer précisément les différentes phases dans lesquelles se trouvent les cellules et de quantifier la mortalité cellulaire par la technique de cytométrie en flux (Figure 42). Après 24 et 48h d'exposition aux particules de tir aux concentrations de 0,05 et 0,1 mg/mL, nous avons observé une augmentation significative de la proportion des cellules mortes (phase sub G0-G1) aux concentrations de 0,1 mg/mL à 24h (x6,6) et à 0,05 et 0,1 mg/mL à 48h de (x2,4 et x3,6 respectivement). On observe également une diminution significative de la proportion des cellules se situant en phase G0-G1 à 24 et 48h pour ces mêmes concentrations. En ce qui concerne les phases S et G2-M, aucune modification n'a été observée (Tableau 17).



Figure 42 : Profil du cycle cellulaire d'une population de cellules A549 témoin après 24h de prolifération.

A		Phase du cycle cellulaire (cellules en %) – 24h					
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M		
	Témoin – 24h	4,6 ± 3,6	72,7 ± 4,0	18,7 ± 4,2	$3,8 \pm 0,9$		
	0,05 mg/mL – 24h	19,6 ± 10,4	62,4 ± 3,9	14,6 ± 5,4	$3,2 \pm 0,9$		
	0,1 mg/mL – 24h	30,4 ± 10,4 *	54,7 ± 6,3 *	12,0 ± 4,2	$2,7 \pm 0,4$		
в		Phase du cycle cellulaire (cellules en %) – 48h					
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M		
	Témoin – 48h	9,0 ± 7,0	71,2 ± 3,8	14,7 ± 4,0	$3,9 \pm 0,4$		
	0.05 ma/mL – 48h	21,9 ± 0,5 *	62,9 ± 2,2 *	12,2 ± 1,5	$2,8 \pm 0,6$		
	, J			22 D	16 15		

Tableau 17 : Effet des particules de tir sur les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549. Les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549 ont été évaluées après exposition aux concentrations de 0,05 et 0,10 mg/mL pendant 24h (A) et 48h (B) dans du milieu de culture à 1% de SVF. Les différentes phases du cycle cellulaire sont identifiées grâce à la technique de la cytométrie en flux et les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules ± écart-type (n=3). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, exposé vs témoin.

Ces particules de tir nous ont donc permis de mettre au point les différents tests biologiques que nous utiliserons pour évaluer la toxicité des particules de fumigènes.

3- Etude de la cytotoxicité des particules de tir : influence du mode d'exposition

Afin de comparer deux méthodes d'exposition différentes des cellules A549 aux particules d'intérêt, nous avons cultivé les cellules A549 sur insert afin de les exposer à l'interface airliquide (ALI). Grâce à la collaboration avec la société VITROCELL®, nous disposions d'un prototype d'exposition par nébulisation d'aérosols liquides permettant de mimer les conditions réelles d'expositions au niveau de l'épithélium alvéolaire en transformant 200 µL d'une suspension de particules en un aérosol particulaire.

Les cellules A549 ont été exposées aux particules à l'interface air-liquide pendant le temps de la nébulisation, c'est-à-dire environ 30 min, puis du milieu de culture a été ajouté et les cellules remises à 37°C pour une phase d'exposition en mode immergé pendant 24h, protocole que nous nommerons « méthode pseudo-ALI ». Un contrôle d'exposition ALI a été réalisé (cellules exposées à du milieu de culture ne contenant pas de particule) et ne montre aucune modification de la viabilité cellulaire. En effet, des études sur la viabilité des cellules ont montré qu'une exposition de 60 min à l'interface ALI induirait des dommages cellulaires contrairement à deux expositions de 30 min avec une période de repos de 14h²²².

Dans cette étude préliminaire, nous avons évalué la cytotoxicité grâce au test Bleu Trypan selon le même protocole que celui utilisé après exposition en mode immergé. Après 24h d'exposition aux particules de tir à des concentrations estimées de 0,10 et 0,25 mg/mL, dans un milieu à 1% de SVF, la cytotoxicité cellulaire est exprimée en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées. L'exposition des cellules en mode pseudo-ALI aux particules de tir a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire dès la concentration de 0,10 mg/mL (64% de viabilité cellulaire obtenue) (Figure 43).



Figure 43 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de tir (0 – 0,25 mg/mL) sur des cellules A549 (milieu de culture 1% SVF) en mode « pseudo-ALI ».

Nous avons comparé nos résultats d'exposition en mode pseudo-ALI aux résultats précédemment obtenus en mode immergé à la seule concentration commune (0,10 mg/mL). Nous avons obtenu un profil de cytotoxicité identique pour les deux protocoles, c'est-à-dire une diminution significative de la viabilité cellulaire à 0,10 mg/mL (60% de viabilité cellulaire obtenue en méthode immergée contre 64% en méthode « pseudo-ALI ») (Figure 41C et 43).

La cytotoxicité des particules de tir a été évaluée après 30 min d'exposition à l'interface air-liquide suivie de 24h post-exposition en mode immergé aux concentrations estimées de 0,10 et 0,25 mg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules viables par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, exposé vs témoin.

III- Discussion de l'étude l

Une personne faisant partie du personnel militaire, que ce soit sur le terrain, gendarme ou même réserviste, est soumise à des séances de tirs d'entraînement répétées. Lors de ces séances d'entraînement, le personnel militaire ainsi que les armuriers, dont le métier consiste à former au tir le personnel militaire, contrôler les munitions, les armes et le bon déroulement de la séance de tir durant toute la journée, sont exposés aux nuages particulaires émis lors de l'éjection de la douille après chaque tir. Il en est de même pour le personnel qui entretient et nettoie le stand de tir (sol, support, pare-balle). Certaines organisations et autorités comme le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) ont donc émis des recommandations pour protéger la sécurité et la santé de ces différentes catégories de tir, de fournir aux personnes exposées des informations sur les dangers des particules de tir ainsi qu'une formation de prévention des risques, d'établir des contrôles réguliers du taux de particules dans l'air du stand de tir, de fournir aux tireurs et aux employés un équipement de protection individuelle adapté ainsi qu'un suivi médical régulier.

C'est pourquoi, dans le but de déterminer la toxicité de ce nuage particulaire, nous avons prélevé les particules émises lors de séances de tir d'entraînement au 9 mm (HK USP) du personnel de la gendarmerie de Toulon ainsi que du personnel réserviste. Ces prélèvements, effectués par impaction en cascade à haut débit, ont permis de récupérer autour de 700 mg de particules en un peu plus d'une quinzaine d'heures. Les concentrations moyennes retrouvées dans l'air ambiant au niveau du stand de tir étaient donc de 284 µg/m³ sur 15h30min. Cette valeur est donc près de dix fois supérieure aux valeurs quides de l'OMS émises pour les PM₁₀ atmosphériques (50 µg/m³ sur 24h)¹³. Les particules récupérées lors de ces séances d'entraînements présentent une granulométrie assez grossière, ayant majoritairement un diamètre aérodynamique compris entre 3 et 7,5 µm. Cette taille de particules a également été retrouvée lors d'une étude américaine réalisée entre 2005 et 2007²²⁴. Il en a été conclu que ces tailles de particules seraient dues à des nanoparticules agglomérées les unes aux autres. En effet, il a été démontré dans la littérature que les particules en suspension issues de petit calibre appartenaient majoritairement à la classe granulométrique des nanoparticules¹⁹⁴. Dans l'étude de Wingfors, il a été observé par le biais d'analyseurs en temps réel, que lors de tir de munitions, le nuage particulaire émis directement après le tir serait composé essentiellement de nanoparticules ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 30 nm (<4 min). Par la suite, entre 4 et 12 min après le tir, la densité totale de ces particules diminuerait de manière exponentielle, diminution probablement liée à une agglomération des particules induisant leur sédimentation sur les surfaces du stand et diminuant leur potentielle inhalation¹⁹⁴. Toutefois, une fois sédimentées, les particules

132

représentent toujours un risque biologique, notamment pour le personnel d'entretien chargé de la bonne tenue des infrastructures.

Pour l'étude des effets induits par ces particules, nous avons utilisé le modèle cellulaire A549, cellules épithéliales alvéolaires largement décrites dans la littérature²²⁵. Afin d'effectuer la mise au point des différents tests de cytotoxicité qui ont ensuite été utilisées pour les particules d'intérêt, nous avons utilisé du chlorure de cadmium comme référence toxique soluble. Le cadmium est un des métaux lourds retrouvé fréquemment dans la composition des particules issues de munitions ainsi que dans la composition de nombreuses particules atmosphériques et dont la cytotoxicité a été décrite dans la littérature^{215,226}. Nous avons déterminé l'IC₅₀ du chlorure de cadmium en utilisant les tests MTT et rouge neutre après 24h et 48h d'exposition à différentes concentrations. Ces deux tests, utilisés pour évaluer respectivement l'activité métabolique mitochondriale et la perméabilité membranaire, permettent de définir de façon complémentaire la cytotoxicité d'une molécule. Nous avons obtenu des valeurs d'IC₅₀ proches de 75 µM pour le test MTT et 50 µM pour le test rouge neutre après 24h d'exposition, valeurs également en accord avec les IC₅₀ retrouvées dans la littérature^{215,216}. Ces résultats ont été confirmés par l'évaluation des mécanismes d'exclusion membranaire par le test Bleu Trypan. Le CdCl₂ a donc permis la mise au point de différents tests de viabilité cellulaire robustes et répétables, évaluant la cytotoxicité de polluant soluble.

En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité des particules, le SVF pourrait induire des artéfacts. En effet, comme le suggèrent quelques études, la présence de SVF dans le milieu de culture favoriserait la formation d'agrégats²¹⁹, diminuant alors le potentiel toxique des particules²²⁷. Malgré la rareté des études de cytotoxicité directe de particules de tir, il existe néanmoins des données sur d'autres types de particules, comme par exemple les particules d'oxyde de cuivre (CuO). Une cytotoxicité de ces particules de CuO a été observé dès les concentrations de 0,01 mg/mL via le même test MTT²²⁸ que nous avons utilisé et dès 80 µg/cm² (0,27 mg/mL) via le test alamar blue²²⁹. Cette toxicité des particules de CuO est plus prononcée avec une proportion de SVF moindre, ce qui pourrait être dû à la diminution du nombre d'agrégats particulaires conduisant à une augmentation de la réponse cytotoxique des cellules. Par conséquent, l'utilisation d'un milieu de culture déprivé en SVF permettrait de diminuer l'agrégation particulaire²²⁹.

Partant de ce postulat, nous avons étudié la cytotoxicité de particules de tir de petit calibre collectées sur la base navale de Toulon et plus particulièrement l'influence que pourrait avoir la concentration de SVF sur cette éventuelle cytotoxicité.

Nous avons donc effectué les tests de viabilité cellulaire dans du milieu de culture contenant 10% et 1% de SVF. Lors de l'utilisation des conditions normales de culture (10% de SVF),

nous avons observé que les particules de tir formaient des amas. Afin d'obtenir une meilleure dispersion des particules dans le milieu, une sonication a été effectuée en se basant sur la littérature^{217,218} et en utilisant du milieu de culture complémenté avec 1% de SVF.

Nous nous sommes préalablement assurés que la prolifération cellulaire, les mécanismes d'exclusion membranaire ainsi que les différentes phases du cycle cellulaire n'étaient pas modifiés avec l'utilisation d'un milieu de culture faiblement pourvu en SVF.

En ce qui concerne les particules de tir, malgré l'étape de sonication et les différents lavages du tapis cellulaire après exposition, nous avons observé la persistance de quelques agrégats particulaires au fond des puits. La présence de ces agrégats particulaires peut expliquer les faibles variations de viabilité cellulaire obtenues avec le test MTT et le test au Bleu Trypan (10% de SVF). En effet, nous avons observé des effets cytotoxiques des particules de tir seulement pour les concentrations les plus fortes. Il est donc indispensable d'effectuer des témoins particulaires sans cellules lors des différents tests utilisant la spectrophotométrie afin de s'affranchir des artéfacts potentiellement induits par les particules résiduelles lors des mesures de viabilité. En ce qui concerne le test rouge neutre, nous avons observé la présence d'un grand nombre d'interférences dans la lecture d'absorbance essentiellement causées par les agrégats particulaires expliquant la taille disproportionnée des écart-types. Nous avons conclu que ces résultats ne pouvaient être interprétés et que cette technique était inappropriée pour l'évaluation de la cytotoxicité de particules.

Ayant observé au microscope optique que les particules de tir formaient toujours des agrégats mais en moindre mesure lors de l'utilisation de milieu de culture avec 1% de SVF, nous en avons déduit que ces derniers étaient dus à la composition des particules elles-mêmes. Cependant nous avons tout de même observé une cytotoxicité plus importante pour les particules de tir avec 1% de SVF par rapport à celle observée avec 10% de SVF, ce qui nous a permis de déterminer une cytotoxicité dose-dépendante à 24h et 48h via le test MTT et Bleu Trypan.

Ces résultats suggèrent donc l'induction de différents processus cellulaires après l'exposition des cellules A549 aux particules de tir. En effet, le dosage MTT permet l'évaluation de l'activité métabolique mitochondriale des cellules nécessaires entre autres à la prolifération cellulaire alors que le test au Bleu Trypan permet d'évaluer l'intégrité de la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de l'évaluation des mécanismes d'exclusion membranaire.

Nous avons par la suite évalué la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire après 24h et 48h d'exposition aux particules de tir et nous avons observé une augmentation significative de la mort cellulaire par l'intermédiaire de l'augmentation de la proportion des cellules mortes (phase sub G0-G1) et une diminution significative de la

proportion des cellules se situant en phases G0-G1. Nous n'avons toutefois pas observé d'arrêt du cycle cellulaire. En effet, aucune modification de la proportion de cellules en phase G2-M n'a été observée, contrairement à l'étude de Liu et son équipe qui a observé une diminution de la proportion de cellules en phase G2-M après l'exposition de nanoparticules d'or au même modèle cellulaire que nous avons utilisé (A549)²³⁰.

Lors de l'évaluation des effets et des mécanismes d'action de l'exposition à un polluant environnemental sur les voies respiratoires in vitro, une des principales difficultés est de reproduire des conditions d'exposition qui imitent de près l'inhalation. C'est pourquoi, après avoir défini la cytotoxicité des particules de tir par exposition immergée, nous nous sommes intéressés à une autre méthode d'exposition mimant les conditions expérimentales au plus proche possible d'une exposition réelle à des particules. Dans cet objectif, grâce à une collaboration avec la société VITROCELL®, nous avons utilisé un système d'exposition adapté permettant une exposition directe à l'interface air-liquide de la lignée cellulaire alvéolaire humaine A549 utilisée dans notre étude, méthode d'exposition déjà utilisée dans la littérature ^{231,232}. Les systèmes VITROCELL®s ont été spécialement conçus et fabriqués pour permettre une exposition directe de cellules ou de tissus à l'interface air-liquide. Cette approche permet donc l'obtention de résultats plus physiologiques que par l'exposition immergée. Depuis une dizaine d'années, ces systèmes ont été utilisés avec succès dans l'analyse de nombreuses substances comme par exemple des émanations d'échappements de moteurs, des produits chimiques industriels, des pesticides, des médicaments ou bien encore des fumées de cigarettes^{233,234}.

Après exposition en mode « pseudo-ALI » des cellules A549 aux particules de tir, nous avons observé une diminution significative de la viabilité cellulaire. Le profil cytotoxique résultant de l'exposition en mode « pseudo-ALI » de ces particules est extrêmement proche des profils obtenus lors des expositions en mode immergé. Cette similitude de profil a également été observée dans d'autres études, avec notamment l'observation de cytotoxicités plus fortes à faibles concentrations avec l'utilisation de la méthode d'exposition en immergé²³⁵. La concentration de particules appliquée aux cellules A549 par dépôt dans chaque puits a été estimée à partir de la concentration en particules de l'aérosol initial. Cette étude est préliminaire et il serait intéressant de poursuivre cette comparaison avec l'évaluation d'autres marqueurs biologiques.

Nous pouvons conclure que ces particules induiraient une mort cellulaire dès 24h d'exposition. Il serait donc intéressant d'approfondir les différents mécanismes de la mort cellulaire afin de déterminer s'il s'agit d'apoptose ou bien de nécrose. Lors des expositions, le milieu de culture utilisé devra être complémenté systématiquement avec seulement 1% de SVF afin de réduire le risque d'agrégation particulaire.

Etant donné que les émissions produites par les armes à feu sont éjectées au niveau de la zone de respiration du tireur, ces derniers peuvent être fortement exposés aux gaz et matières particulaires produites par des tirs. Dans les munitions traditionnelles, le plomb est un élément important à la fois de la balle et du mélange primaire d'amorçage et peut pénétrer facilement dans le flux sanguin par le biais de l'exposition par inhalation et conduire à des effets très préoccupants sur la santé^{236,237}. Le plomb a été remplacé au sein de l'amorce par une variété d'éléments tels que le strontium, le potassium, le silicium ou encore le titane¹⁹². De nouvelles munitions avec une teneur en plomb amoindrie ont également vu le jour avec par exemple un noyau de plomb partiellement ou complètement chemisé d'un métal plus résistant tel que le cuivre, afin d'éviter la déformation et le décapage préjudiciable de la balle par les rainures du canon, ce qui conduirait à la libération de plomb¹⁹². Un revêtement total est censé réduire l'exposition des tireurs et des instructeurs en empêchant la base en plomb d'être exposée aux gaz propulseurs chauds provoquant l'érosion du plomb et libérant des particules. Ces munitions chemisées avec du cuivre ont abouti à une réduction de 89 % des niveaux de plomb dans des échantillons d'air avec observation d'une diminution du taux de plomb dans le sang des tireurs²³⁷. La plupart des munitions sont donc composées de nos jours de laiton (30% de zinc et 70% de cuivre) mais aussi d'acier, de cuivre, de dorure métallique, d'aluminium ou même de plastique afin de limiter l'émanation de plomb. La réduction de l'exposition au plomb par inhalation a donc été une préoccupation majeure au sein des domaines civil (compétition et association de tir) et militaire.

Nous retrouvons comme composé majoritaire de nos échantillons le plomb à hauteur de 4,64% suivi du calcium 1,80%, du baryum 0,81% et de l'aluminium 0,63%. Les balles standards utilisées par la gendarmerie étant censées être entièrement chemisées, le plomb ainsi que les éléments retrouvés dans nos échantillons peuvent provenir du canon, de l'alliage de la cartouche, encore de l'amorce utilisée pour la propulsion de la balle et également du pareballe situé à une vingtaine de mètres du tireur. Les mélanges d'amorces sont constitués de quatre composants chimiques de base : l'explosif d'amorçage, l'agent oxydant, le combustible et le sensibilisateur. A l'origine, la catégorie des explosifs d'amorçage comprenait principalement le fulminate qui est remplacé depuis quelques décennies par d'autres produits plus stables et non corrosifs comme le styphnate de plomb et de trinitrotoluène ou azoture de plomb (Pb(N₃)₂) (1 à 7 mg par tir) ce qui pourrait justifier le plomb retrouvé dans nos échantillons^{236,239}. Le nitrate de baryum est l'oxydant le plus couramment utilisé dans des munitions d'armes légères avec le chlorate de potassium et le nitrate de plomb, justifiant la présence de baryum et de potassium au sein de nos particules. Les combustibles les plus

utilisés dans la littérature sont le sulfure d'antimoine, la nitrocellulose et la poudre d'aluminium¹⁹³ justifiant la proportion non négligeable d'antimoine (0,8%) retrouvée ainsi que l'aluminium. La limite légale d'exposition permise en suspension dans l'air d'antimoine est de 0,5 mg/m³ en moyenne sur 8 heures²⁴⁰. L'exposition chronique à l'antimoine dans l'air à des concentrations de 9 mg/m³ peut exacerber l'irritation des yeux, de la peau et des poumons et entraîner une pneumoconiose, des électrocardiogrammes altérés, des douleurs à l'estomac, des diarrhées, des vomissements et des ulcères d'estomac, résultats confirmés chez l'animal en laboratoire²⁴¹. À la vue des guantités relativement faibles retrouvées dans nos particules (2 µg/m³) par rapport aux limites d'expositions, l'antimoine ne présente probablement pas de risque sérieux pour les tireurs et le personnel de tir¹⁹³. Le trinitrotoluène est le sensibilisateur standard utilisé, qui aide à transférer une compression mécanique au sein de l'amorce permettant l'explosion puis la propulsion de la balle²³⁸. Les éléments Cu, Zn et Fe retrouvés en faible proportions ont sûrement été apportés par les couches de revêtement de la cartouche de la balle et par l'alliage composant le canon. Les dépôts à l'intérieur du canon pourraient apporter des éléments supplémentaires aux éléments analysés, il serait donc intéressant d'essayer de récupérer ces particules lors de la maintenance et de l'entretien des armes de poing.

Les tireurs sont donc exposés au plomb par les aérosols libérés lors du tir, que ce soit par leur propre arme ou par celles de tireurs voisins. Lors d'une étude réalisée sur l'exposition au plomb dans les salles de tir²⁴², la concentration atmosphérique moyenne en plomb s'élevait à 0,473 mg/m³ sur une durée de prélèvement de 15 à 140 minutes (50 mesures réalisées). Par comparaison, la Valeur Moyenne d'Exposition (VME) ou la Valeur Limite d'Exposition Professionnel (VLEP) est de 0,1 mg/m³ en moyenne sur 8h²⁴³. La quantité de plomb retrouvée dans nos échantillons, correspondant à 4,6% soit 23,4 µg/m³ lors de la campagne de 2014 et 23% correspondant à 56,3 µg/m³ lors de la campagne de 2015, concentration qui serait en dessous de la VLEP du plomb, tout en sachant que le temps de prélèvement des particules a dépassé les 13h alors que la VLEP se base sur un temps d'exposition de 8h. Il faut également prendre en compte que notre prélèvement ne représente pas la totalité des particules émises puisque les impacteurs ne peuvent prélever les particules d'un diamètre inférieur à 0,49 µm.

Les particules d'intérêts étant issues de munitions chemisées, il est donc normal de retrouver du cuivre dans nos échantillons, à hauteur de 1,4%, soit 3,6 µg/m³, valeur bien en dessous de la VLEP du cuivre sous forme de poussière qui est de 1 mg/m³. Lors d'une étude de Voie et son équipe, les émissions et les effets sur la santé de tirs de munitions avec plomb, sans plomb et sans plomb modifiées (base du projectile effilée donc moins de frottement) ont été comparées les unes par rapport aux autres après 1h de tir en milieu confiné sans ventilation²⁴⁴. Dans ces conditions, les concentrations de particules et de cuivre ont dépassé leurs valeurs

limites respectives d'exposition professionnelle avec des valeurs significativement supérieures pour les munitions sans plomb par rapport aux munitions avec plomb. Le nombre total de symptômes rapportés (maux de tête, fièvre, frissons, toux, essoufflement, malaise) était également significativement plus élevé chez les tireurs utilisant des munitions sans plomb par rapport aux utilisateurs de munitions avec plomb et sans plomb modifiées. Lors de l'utilisation de munition sans plomb, plus 70% du métal présent dans les émissions était en cuivre avec une concentration de 5,4 mg/m³, valeur bien au-dessus de la VLEP du cuivre²⁴⁵. En effet, les munitions sans plomb induisent une usure plus grande du canon du fusil, due au noyau de la munition en acier et non en plomb perdant la haute capacité à se déformer lors de son trajet dans le canon et provoquant ainsi plus de frottements, l'usure du canon et la production de particules de cuivre. Cela pourrait expliquer alors pourquoi les munitions sans plomb émettent plus de cuivre et de zinc que les munitions au plomb²⁴⁴. La toxicité des nanoparticules de cuivre a été largement étudiée, que ce soit sur des modèles in vitro ou in vivo. Il a été démontré que les nanoparticules d'oxyde de cuivre étaient génotoxiques²²⁸, irritantes et proinflammatoires aux niveaux des poumons²⁴⁶. Elles induisent également un stress oxydant et une cytotoxicité au sein de cellules épithéliales des voies respiratoires²²⁹, ce qui expliquerait les différents symptômes respiratoires observés. Il a également été constaté que l'exposition par inhalation à des nanoparticules de cuivre peut induire leur pénétration au niveau du noyau et de la mitochondrie par endocytose, induisant la formation d'EROs et une inflammation pulmonaire subséquente résultant de dommages mitochondriaux et à l'ADN, conduisant par la suite à l'apoptose^{247,248}. Ces études pourraient donc expliquer en partie la cytotoxicité observée des particules de tir sur les cellules A549.

Les conclusions de ces études devraient être utilisées pour élaborer des mesures de préventions qui permettront de réduire l'exposition associée à l'utilisation d'armes à feu et des différentes munitions mises sur le marché. Ces informations peuvent être utilisées afin d'améliorer la conception des munitions et de réduire les émissions des métaux lourds dangereux pour la santé et l'environnement. Les émissions issues de tirs peuvent avoir une composition et des effets toxiques différents en fonction de l'arme et des munitions utilisées ; c'est pourquoi les stands de tir devraient être équipés d'une ventilation forcée avec une circulation de l'air dans la direction des tirs et une extraction au niveau du pare-balles. Avec les normes de ventilation respectées, le problème de l'exposition aux substances nocives des tireurs et des instructeurs pourrait être résolu dans la plupart des salles de tir, quelles que soient les munitions employées. Le nettoyage et l'entretien des stands de tir devraient également être effectués par du personnel compétent et qualifié appliquant les mesures de protection individuelle adéquates (masque, gants, lunettes...). Malgré de faibles concentrations de métaux dans les aérosols prélevés, nous avons observé des effets

cytotoxiques des particules de tir de 9 mm. Il est donc important d'actualiser les différentes valeurs limites d'expositions et d'évaluer régulièrement l'air inhalé par le personnel militaire et civil en stand de tir afin d'assurer au mieux la protection de leur santé.

Étude 2 : Caractérisation physico-chimique et analyse toxicologique des particules de fumigènes.

I- Campagne de prélèvement et caractérisation physico-chimique des particules de fumigènes.

Les particules de fumigènes ont été prélevées à l'aide d'impacteurs en cascade lors de deux campagnes de prélèvements réalisées sur le site de d'expérimentation de la DGA (octobre 2014 et juin 2015). Les fumigènes prélevés étaient un fumigène coloré (n°1), deux fumigènes anti-intrusions (n°2 et 3) et un fumigène à base d'hexachloroéthane (n°4).

1- Granulométrie par analyseur de particules

Lors de la 2^{ème} campagne de prélèvement (juin 2015), des mesures en temps réel de la granulométrie des particules ont été effectuées. Deux analyseurs ont été utilisés conjointement pour déterminer la concentration (particules/cm³) et la distribution en taille des aérosols en temps réel : l'OPS 3330 pour les aérosols entre 0,3 et 10 µm (selon 16 classes de taille) et le SMPS 3910 pour les aérosols compris entre 10 et 400 nm (répartis en 13 classes de taille). Les résultats obtenus par ces analyseurs en temps réel sont montrés en annexes et décrits cidessous.

En ce qui concerne le fumigène 1, on note que de fines particules sont formées majoritairement dans les premiers instants (majorité de particules comprises entre 100 et 200 nm durant les 5 premières minutes) et qu'elles sont rapidement remplacées par des particules de taille plus importante (> 200 nm). Dix minutes environ après le déclenchement des tirs, des aérosols de plus grosse taille apparaissent (entre 1 à 2 μ m) puis on note en fin de tir une augmentation des aérosols fins (< 1 μ m) et ce avec les deux appareils de mesure. Pour les fractions les plus fines (<300 nm), il semble y avoir plusieurs vagues d'émissions de particules avec la majorité des aérosols émis ayant une taille comprise entre 150 et 300 nm pour les fractions les plus fines (SMPS) (Annexe 3). Pour les aérosols de taille comprise entre 300 nm et 10 μ m (OPS), la quasi-totalité des particules a une taille inférieure à 1 μ m. Toutefois, les particules les plus fines mesurées par SMPS sont environ 10 fois plus nombreuses (1 400 000 particules mesurées sur le SMPS et 120 000 mesurées avec l'OPS) (Annexe 4). Ces résultats sont en bonne cohérence avec les données issues de la pesée des plaques d'impaction et des back-up (Figure 44).

Pour le fumigène 2, en tout début de tir on observe la présence d'aérosols fins (compris entre 100 et 200 nm) qui restent majoritaires jusqu'à la fin du tir (Annexe 5). Les données de l'OPS montrent également que l'aérosol est formé de particules de faible taille (classe majoritaire 0,3 µm) qui sont nettement moins abondantes que celles mesurées par le SMPS. Le fumigène 2 présente un aérosol plus fin et nettement plus dense que les trois autres (500 000 particules de 125 nm/cm³ contre 150 à 200 000 particules de 200 nm/cm³ pour les mesures réalisées à l'aide du SMPS) (Annexe 6). Ces résultats sont également en bonne cohérence avec les

données issues de la pesée des plaques d'impaction et des back-up qui montraient que cet aérosol était plus fin que celui formé par les autres fumigènes (Figure 44).

Pour le fumigène 3, la majorité des aérosols émis a une taille comprise entre 100 et 200 nm pour les données recueillies avec le SMPS. Il semble y avoir plusieurs vagues d'émission de particules (Annexe 7). Les données de l'OPS permettent d'observer que l'aérosol est formé de particules de petite taille (classe majoritaire 0,3 μ m) en quantité nettement moins abondante que celles mesurées par le SMPS (250 000 particules /cm³ avec OPS et 1 200 000 particules /cm³ avec SMPS). En fin du second tir, on note une augmentation des aérosols fins (< 1 μ m) (Annexe 8). Ces résultats sont également en bonne cohérence avec les données issues de la pesée des plaques d'impaction et des back-up (Figure 44).

Pour finir, en ce qui concerne le fumigène 4, pour les mesures avec le SMPS, les tirs 1 et 2 présentent majoritairement des aérosols de taille comprise entre 100 et 300 nm, tandis que le tir 3 est majoritairement composé d'aérosols compris entre 80 et 150 nm. Pour les mesures réalisées avec l'OPS, on remarque nettement que les aérosols sont émis en deux vagues successives et ce pour les trois tirs (ce qui apparaît pour certaines classes de particules dans les mesures réalisées avec le SMPS) (Annexe 9). Tous les aérosols ont une taille inférieure à 2 µm (sauf dans le tir 3 où on note la présence d'aérosols de 2,5 µm). Leur concentration est inférieure d'un facteur 10 à celle des aérosols compris entre 10 et 400 nm (exemple tir 1 : OPS = 14 000 particules/cm³ et SMPS = 200 000 particules/cm³) (Annexe 10). Par rapport aux trois autres fumigènes testés, l'hexachloroéthane présente donc deux modes granulométriques : l'un entre 15 et 35 nm et l'autre entre 150 et 200 nm. Ces résultats sont vérifiés pour les trois tirs.

La classe majoritaire de particules par fumigène ainsi que son pic d'émission associé est résumé dans le tableau 18 ci-dessous (Tableau 18).
Fumigène	Tir	Mesures SMPS (10 – 400 nm)		Mesures OPS (0.3 – 10 μm)	
Tumgene	10	Pic d'émission (particules / cm ³)	Classe majoritaire	Pic d'émission (particules / cm ³)	Classe majoritaire
Fuminàna 1	1	200 000	250	10 000	0.2 -+ 1
Fumigène 1	2	100 000	250 nm	10 000	0,5 et 1 µm
Fumigène 2	1	500 000	125	-	7
	2	450 000	125 nm	25 000	0,3 µm
Fumigàna 2	1	200 000	200	15 000	0.2
Futfligene 3	2	150 000	200 nm	25 000	0,5 μm
	1	180 000	200	12 000	0.4
Fumigène 4	2	140 000	200 nm	16 000	0,4 µm
	3	60 000	100 nm	10 000	0,3 et 1 µm

Tableau 18 : Classe majoritaire de particules et pic d'émission associé lors de tir de fumigènes.

2- Granulométrie par mesure pondérale

La majorité des particules prélevées lors des différents tirs de fumigènes ont un diamètre aérodynamique inférieur à 0,95 µm (particules prélevées sur les étages 5 et 6 des impacteurs en cascade). En effet, plus de 90% des particules prélevées de fumigènes 1, 2, 3 et plus de 75% des particules prélevées du fumigène 4 sont compris entre 0,95 et 0,49 µm. Les particules de fumigènes récupérées sont de l'ordre de la taille des particules fines (<3 µm), taille qui favoriserait leur dépôt dans les voies respiratoires distales, au niveau des bronchioles et alvéoles (Figure 44). Pour le fumigène 2, la très grande majorité des particules ont été récupérées par le filtre terminal (back-up) et correspondent donc à des particules de plus petites tailles (nanoparticules).



Figure 44 : Mesure pondérale moyenne des particules de fumigènes. Les particules de fumigènes sont collectées par un impacteur lors d'un tir de fumigène sur le site d'expérimentation de la DGA en octobre 2014 et juin 2015 en fonction de leur diamètre aérodynamique. Les particules de différentes tailles ont été récoltées sur les différentes plaques d'impactions de manière décroissante. Les fumigènes 1, 2, 3 et 4 sont notés respectivement F1, F2, F3 et F4.

Nous nous sommes premièrement intéressés à la granulométrie des particules récoltées ainsi qu'à leur concentration dans l'air ambiant. Les fumigènes 1, 3 et 4 produisent en moyenne de 40 à 50 fois plus de particules comprises entre 3 et 0,49 µm que les tirs de petit calibre (11,5 et 14,5 mg/m³ contre 0,3 mg/m³). Pour le fumigène 2, la concentration en particules de cette classe de taille n'est que de 1,6 mg/m³. Le tableau 19 ci-dessous résume l'ensemble des données issues de l'échantillonnage des particules PM₃ et PM_{>3} après plusieurs sessions de tirs de fumigènes (Tableau 19).

Type de particules	PM	Masse collectée (mg)	Durée de prélèvement (h)	Débit	Volume pompé (m³)	Concentration PM Air (µg/m³)
Eumigàno 1	PM _{>3}	0	0,86	2 x 80 m³/h	95,5	0
Futtigene I	PM ₃	1099,3				11 510,9
Fumigène 2	PM _{>3}	0	0.05	2 x 80 m³/h	152	0
	PM ₃	246,9	0,35			1 624,3
Fuminàno 3	PM _{>3}	0	1,15	2 x 80 m³/h	184	0
runngene 5	PM ₃	2394,2				13 011,9
Fumigène 4	PM _{>3}	42,5	0,70	2 v 80 m ³ /h	112	379,4
	PM ₃	1620		2 x 80 m²/n	112	14 464,2

 Tableau 19 : Ensemble des données de prélèvements sur les différents étages des impacteurs et concentrations des particules issues de tirs de fumigènes.

Les fumigènes testés ont entrainé l'émission de deux types d'aérosols avec deux comportements très différents. Deux fumigènes (n°1 et n°4) ont émis des particules solides que l'on peut piéger avec les moyens habituels tels que les plaques d'impaction (particules libres) et leurs « back-up » associés (particules sur support). Ce prélèvement de particules libres a permis de mettre en évidence une quantité importante de particules de taille inférieure à 0,95 µm (Figure 44). Les deux autres fumigènes (n°2 et n°3) émettent un aérosol majoritairement liquide une fois récolté par impaction (micro-gouttelettes) qui va s'agglomérer sous forme d'un gel sur les supports, ne permettant donc pas de définir la taille de ces aérosols après impaction. La concentration totale de matière piégée par les plaques d'impaction et par le back-up varie de 16,4 (fumigène 2) à 20,9 mg/m³ (fumigène 4) (Tableau 20).

	Fumigène 1	Fumigène 2	Fumigène 3	Fumigène 4
Туре	Fumigène de signalisation rouge	Fumigène anti- intrusion, fumée blanche	Fumigène anti- intrusion, fumée blanche	Fumigène à base d'hexachloroéthane
Dates de prélèvements	14/10/2014 et 03/06/2015	14/10/2014 et 02/06/2015	14/10/2014 et 03/06/2015	03/06/2015
Aspect des échantillons récoltés	Poudre rouge foncé	Pâte marron foncé très collante	Pâte marron foncé très collante	Aspect goudronneux noir, paillettes
Concentration de particules prélevées sur impacteur et back- up (µg/m ³)	18222	16374	19410	20862

 Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différents fumigènes collectés sur le site d'expérimentation de la DGA lors des deux campagnes de prélèvements en octobre 2014 et juin 2015.

3- Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire C, H, N, S indique que ces particules contiennent une grande quantité de matière organique pour F1, F2 et F3 (Figure 45).



Figure 45 : Analyse élémentaire C, H, N, S des particules de fumigènes exprimée en % de l'échantillon. Les fumigènes 1, 2, 3 et 4 sont notés respectivement F1, F2, F3 et F4.

En effet, les particules issues du fumigène 1 sont chargées en carbone à hauteur de 70% ainsi que celles issues du fumigène 3 à hauteur de 68%. Les fumigènes 2 et 4 ont une teneur en carbone plus faible, respectivement de 21% et 2%. Les teneurs en hydrogène restent assez faibles, avec des valeurs inférieures à 10% pour tous les fumigènes. Seul le fumigène 1 comporte de l'azote à hauteur de 8% et aucun de ces quatre fumigènes ne renferme du soufre dans sa composition. Nous pouvons donc déduire de ces résultats que les particules de F1, F2 et F3 sont composées majoritairement de composés organiques contrairement aux particules de F4, qui elles sont probablement riche en molécules inorganiques.

4- Analyse des composés métalliques

Les analyses par ICP-optique ont été effectuées de façon à déterminer les teneurs globales en métaux présents (Tableaux 21 à 24). Le fumigène 1 est riche en potassium à hauteur de 0,76% des métaux analysés. On détecte également la présence en faible proportion (<0,1% chacun) de soufre, de baryum. Parmi les éléments métalliques, on relève également la présence en faible proportion (<0,1% chacun) de chrome (Cr), cuivre (Cu), fer (Fe), plomb (Pb) et zinc (Zn) (Tableau 21).

Campagne 1 – Fumigène 1					
Eléments	mg/kg	%			
Al	<20	0			
Ba	242	0,02			
Ca	<100	0			
Cr	23,8	0			
Cu	<10	0			
Fe	4,5	0			
\sim	7 590	0,76			
Mg	<20	0			
Mn	<10	0			
Мо	<10	0			
Na	27,2	0			
Ni	<10	0			
Р	23,9	0			
Pb	10,2	0			
9	541	0,05			
Si	Interf	Interf			
Sr	<10	0			
Ti	<10	0			
V	<10	0			
Zn	34,8	0			

Tableau 21 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 1 en mg/kg.Interf : interférence lors de l'analyse.

Le fumigène 2 est très riche en potassium, avec un pourcentage estimé de 20% dans les particules libres. On y détecte également des teneurs importantes en soufre, magnésium, aluminium (faiblement soluble) et dans une moindre mesure en calcium, sodium, baryum et phosphore. Pour les éléments métalliques, on relève également la faible présence de plomb, fer, cuivre et zinc (Tableau 22).

Campagne 1 – Fumigène 2					
Eléments	mg/kg	%			
AD	1 415	0,14			
Ba	549	0,05			
Ca	737	0,07			
Cr	<50	0			
Cu	311	0,03			
Fe	601	0,06			
K	202 982	20,30			
M	2 500	0,25			
Mn	<50	0			
Мо	<50	0			
Na	626	0,06			
Ni	<50	0			
Р	422	0,04			
Pb	1 017	0,10			
S	3 171	0,32			
Si	Interf	Interf			
Sr	<50	0			
Ti	<50	0			
V	<50	0			
Zn	131	0,01			

Tableau 22 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 2 en mg/kg.Interf : interférence lors de l'analyse.

En ce qui concerne la composition en métaux du fumigène 3, l'élément majoritaire reste le potassium (0,3%), comme pour les autres fumigènes mais en plus petite quantité. On retrouve également de faibles teneurs en aluminium, sodium, soufre, cuivre, fer et plomb (Tableau 23).

Campagne 1 – Fumigène 3					
Eléments	mg/kg	%			
Al	560	0,05			
Ba	3,4	0			
Ca	<100	0			
Cr	<25	0			
Cu	27,3	0			
Fe	16,1	0			
\sim	2 991	0,30			
Mg	<20	0			
Mn	<10	0			
Мо	<10	0			
Na	199	0,02			
Ni	<10	0			
Р	16,6	0			
Pb	12,2	0			
S	159	0			
Si	Interf	Interf			
Sr	<10	0			
Ti	<10	0			
V	<10	0			
Zn	9,3	0			

Tableau 23 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 3 en mg/kg.Interf : interférence lors de l'analyse.

Après analyse des particules issues des tirs du fumigène 4, l'aluminium a été retrouvé comme composé majoritaire à hauteur de 10,6% des particules libres. De plus faibles teneurs en fer (1,2%), calcium (0,9%), potassium (0,18%), magnésium et soufre sont également détectées. Il a été également détecté la présence d'étain (0,09% dans les particules libres) et de tungstène en faible teneur, éléments non détectés dans les autres fumigènes (Tableau 24).

Campagne 2 – Fumigène 4					
Eléments	mg/kg	%			
AD	105 853	10,59			
Ba	19	0			
0	9 554	0,96			
Cr	87	0			
Cu	108	0,01			
Ē	12 093	1,12			
8	1 843	0,18			
Mg	795	0,8			
Mn	33	0			
Мо	<2	0			
Na	<200	<0,02			
Ni	23	0			
	<100	0			
Pb	41	0			
S	782	0,08			
Sb	37	0			
Si	476	0,05			
S	894	0,09			
Sr	4	0			
Π	21	0			
v	<20	0			
W	43	0			
Zn	940	0,09			

Tableau 24 : Composition en métaux (ICP-optique) des particules issues du fumigène 4 en mg/kg.Interf : interférence lors de l'analyse.

Pour les quatre fumigènes, nous retrouvons des éléments majoritaires communs que sont le potassium, l'aluminium et le soufre. (Tableau 25)

Fumigènes	Fumigène 1	Fumigène 2	Fumigène 3	Fumigène 4
Éléments métalliques majoritaires	K, Sb, S, Ba	K, S, Mg, Al	K, Al, Na, S	Al, Fe, Ca, K, Mg, S

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des éléments métalliques majoritaires composants les particules issues des quatre fumigènes.

5- Analyse des composés organiques

Afin d'analyser les composés organiques, les échantillons sont soumis à une extraction par soxhlet avec du dichlorométhane puis l'extrait obtenu est analysé par GC-MS. Les résultats obtenus pour la fraction organique des particules du fumigène 1 (>70%) sont regroupés dans la figure 46 et le détail des composés figure dans l'annexe 11.

L'analyse GC-MS indique la présence de nombreux composés aromatiques et polyaromatiques, avec ou sans hétéroatomes (N ou O) tels que :

- des diazènes, 1,2-Naphthalenedione, 1-[(3-methoxyphenyl)hydrazone], 2-naphthalénol et encore méthoxyphényl azo qui sont liés à la coloration rouge du fumigène 1.

- des amines aromatiques (toluidine, méthoxybenzamine, méthylbenzamine, méthoxyformanilide, amino-naphtalène) et dérivés, divers hydrocarbures aromatiques polycycliques avec un hétéro-atome azoté (carbazoles, quinolinones, acridines, phénantrolines, benzonaphtocinnoline ou dibenzophenazine).

- des dérivés nitriles aromatiques (hydroxybenzonitrile) et des isocyanates (méthoxy isocyanato benzène, naphtalène isocyanate, ...).

- des HAPs et oxy-HAPs.

- des hydroxy-HAPs (hydrohypyrene, naphtenol).

- des quinones (trimethylanthraquinone).

- des dérivés du naphtalène et du phénanthrène.



Figure 46 : Familles de composés organiques majoritaires du fumigène 1 analysés par GC/MS. Les composés majoritaires sont le 1,2-Naphthalenedione, 1-[(3-methoxyphenyl)hydrazone] (73%) appartenant aux dérivés du naphtalène et le 2-aminoanisole, 2-methoxyaniline (o-anisidine) (10,5%) appartenant aux dérivés des benzènamines.

En ce qui concerne la composition de la fraction organique du fumigène 2 (>20%), les chromatogrammes (non présentés) rappellent une allure de coupe pétrolière et contiennent majoritairement des pics correspondant au phénanthrène, anthracène et leurs dérivés alkylés (38%) tels que le méthylphénanthrène, le diméthylanthracène, le méthyléthylanthracène, le méthyl-éthyléthylphénanthrène, le triméthylphénanthrène ou encore l'isopropylméthylphénanthrène. On observe également le 10,18-bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaéne en assez grande proportion (11%), qui est un dérivé hydrogéné du méthyl-méthyléthylphénanthrène, ainsi que d'autres dérivés polyaromatiques divers (3%) (fluorène et dérivés alkylés) et des biphényles (3%) (diethyl biphényl, diisopropylbiphenyl). Certaines des structures identifiées présentent des similarités étroites avec des dérivés d'acides résiniques. Les composés retrouvés dans la fraction organique des particules du fumigène 2 sont présentés dans l'annexe 12 et regroupés en familles de composés dans la figure 47.



Figure 47 : Composés organiques majoritaires du fumigène 2 analysés par GC/MS.

Après analyse des composés de la fraction organique du fumigène 3 (>70%), les composés sont essentiellement des composés polycycliques appartenant à la famille des triterpénoïdes et sont regroupés dans l'annexe 13.

Les composés retrouvés dans la petite fraction organique des particules du fumigène 4 (<10%) sont présentés dans l'annexe 14 et regroupés dans la figure 48. Ce sont principalement des molécules chlorées même si paradoxalement l'hexachloroéthane n'est pas du tout détecté. Ceci a d'ailleurs été confirmé par l'injection d'un standard. Après vérification dans la bibliographie, lors de tirs de fumigène à base d'hexachloroéthane, il y a dégradation de ce dernier et formation de chlorures de fer, de zinc et d'aluminium (métaux retrouvés en proportion majoritaire lors de l'analyse des éléments métalliques) ainsi que de composés organiques chlorés tels que l'hexachlorobenzène, l'octachlorostyrène, voire de dioxines et de

dibenzofuranes^{249,250}. On retrouve donc des composés aromatiques ou polyaromatiques chlorés provenant probablement de la décomposition plus ou moins complète de l'hexachloroéthane. On retrouve également l'octachloronaphtalène (11%) et l'octachloroacénaphtylène (10%) en quantité non négligeable.



Figure 48 : Composés organiques majoritaires du fumigène 4 analysés par GC/MS.

Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas retrouvé la présence de lactose, composé annoncé comme étant potentiellement présent dans la plupart des fumigènes.

La fraction organique des quatre fumigènes est donc composée de molécules complètement différentes comme indiqué dans le tableau 26.

Fumigènes	Fumigène 1	Fumigène 2	Fumigène 3	Fumigène 4
Composés organiques majoritaires	Naphtalène	Phénanthrène / Anthracène	Composés polycycliques	Hexachloro- benzène

 Tableau 26 : Tableau récapitulatif des composés organiques majoritaires des particules issues des quatre fumigènes.

II- Étude de la toxicité des particules de fumigènes

La mutagénicité des extraits organiques (EO) préparés à partir des quatre différents fumigènes a été évaluée par l'intermédiaire du test d'Ames. Compte tenu de l'aspect des prélèvements issus des fumigènes 2 et 3 (gel solidifié), la cytotoxicité n'a été évaluée que pour les fumigènes 1 et 4. Suite aux observations issues des tests biologiques effectués sur les particules de tir, l'étude de la cytotoxicité a été réalisée après exposition des cellules A549 aux particules de fumigène dans du milieu de culture contenant 1% de SVF afin de limiter le phénomène d'agrégation particulaire. De plus, l'évaluation de la perméabilité membranaire au rouge neutre n'a pas été retenue pour évaluer l'effet des particules de fumigènes. Les tests de cytotoxicité MTT, Bleu Trypan et l'évaluation de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire ont donc été réalisés dans ces conditions. Les résultats de cytotoxicité seront mis en regard des données physico-chimiques afin de faire ressortir les paramètres importants impliqués dans les effets biologiques.

1- Évaluation de la mutagénicité

La mutagénicité a été déterminée sur des EO préparés à partir de particules en utilisant le test d'Ames sur diverses souches de *Salmonella Typhimurium*. Chaque souche est spécifique d'un mécanisme de mutation et/ou d'une famille chimique.

a. Mutagénicité des EO de fumigène 1

Les EO de fumigène 1 affichent un comportement mutagène envers les souches TA98 et YG1041.

Une mutagénicité directe dose-dépendante (Figure 49A) a été observée uniquement pour la souche YG1041. Cette souche surexprime les enzymes nitroréductases et O-acétyltransférases nécessaires à la biotransformation des composés nitrés en intermédiaires mutagènes. La mutagénicité directe significative observée uniquement à la plus forte concentration pourrait donc être liée à la présence de composés nitrés dans les extraits organiques des particules du fumigène 1. Une faible toxicité (évaluée par l'observation microscopique du tapis bactérien) a également été observée avec la souche TA102 à la plus forte dose testée.

Après addition des enzymes microsomales (S9mix), les réponses mutagènes ont été fortement augmentées, principalement pour la souche YG1041 mais aussi pour TA98 (Figure 49B). Le S9mix apporte un bagage enzymatique nécessaire à l'activation métabolique des composés aminés en intermédiaires eux-mêmes biotransformés ensuite par les O-acetyltransférases. Cette augmentation de réponse en présence de S9mix permet donc d'appuyer l'hypothèse que des composés aminés seraient fortement impliqués. Ces produits chimiques sont bien connus tant pour leur mutagénicité indirecte que pour leurs propriétés

tinctoriales. Il est à noter que la mutagénicité était associée à un effet bactéricide à 75 µg équivalent particules/boîte, et donc, a été sous-estimée à cette dose. Les niveaux de réponses plus faibles observés avec la souche TA98 seraient alors attribuables à des activités enzymatiques moindres pour cette souche (pas de surexpression contrairement à la souche YG1041).

Il faut souligner qu'en l'absence de S9mix, la couleur rouge intense est restée sur les parois des tubes en plastique utilisés pour mélanger les réactifs avant étalement sur les boîtes de Pétri. Seuls quelques amas colorés de très petites tailles ont été observés à la surface des géloses. Au contraire, la coloration semblait homogène dans le mélange dans les conditions avec S9mix, laissant supposer une adsorption des molécules colorées sur les protéines du S9mix, et conduisant à une coloration nette et régulière à la surface des boîtes de Pétri. Ainsi, la mutagénicité directe observée pourrait avoir été sous-estimée du fait d'une biodisponibilité limitée en absence de fraction protéique.



Figure 49 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 1 vis-à-vis de cinq 5 souches de Salmonella Typhimurium (test d'Ames).
 Les quantités sont exprimées en équivalent massique de particules/boîte. * : Réponse mutagène significative (nombre de révertants induits ≥ 2 fois le nombre de révertants spontanés).

b. Mutagénicité des EO de particules de fumigène 2

Une augmentation significative du nombre de révertants (facteur 2,6) n'est observée que visà-vis de la souche YG1041 pour la concentration la plus élevée (75 µg équivalent particules par boîte) en présence de S9mix (Figure 50B). Une légère toxicité est observée avec la souche TA102, à la plus forte concentration et en présence de S9mix.



Figure 50 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 2 vis-à-vis de cinq souches de Salmonella Typhimurium (test d'Ames).
 Les quantités sont exprimées en équivalent massique de particules/boîte. * : Réponse mutagène significative (nombre de révertants induits ≥ 2 fois le nombre de révertants spontanés).

c. Mutagénicité des EO des particules de fumigène 3 et 4

Aucune mutagénicité directe ou indirecte n'a été observée pour les fumigènes 3 et 4 (Figure 51 et 52).



Figure 51 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 3 vis-à-vis de cinq souches de Salmonella Typhimurium (test d'Ames). Les quantités sont exprimées en équivalent massique de particules/boîte.



Figure 52 : Évaluation de la mutagénicité directe (A) et indirecte (B) des extraits organiques issus des particules de fumigène 4 vis-à-vis de cinq souches de Salmonella Typhimurium (test d'Ames). Les quantités sont exprimées en équivalent massique de particules/boîte.

2- Évaluation de l'activité mitochondriale et des mécanismes d'exclusion membranaire

L'activité mitochondriale (test MTT) est évaluée après 24h et 48h d'exposition à des concentrations croissantes (0 - 0,35 mg/mL) de particules des fumigènes 1 et 4. Elle est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules non traitées.

Concernant le fumigène 1, nous observons une cytotoxicité significative uniquement à la plus forte concentration testée (0,35 mg/mL), aussi bien après 24h d'exposition (diminution d'un facteur 2,17) qu'après 48h (diminution d'un facteur 3,86) (Figure 53).



Figure 53 : Cytotoxicité (Test MTT) des particules de fumigène 1 (0 - 0,35 mg/mL) sur cellules A549. La cytotoxicité des particules de fumigène 1 a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées en moyennes ± écart-type (n=3). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

L'évaluation de l'intégrité membranaire a ensuite été effectuée grâce au test au Bleu Trypan réalisé après 24h et 48h d'exposition, à des concentrations de 0,10 et 0,25 mg/mL (figure 54). Le fumigène 1 a entraîné une diminution dose-dépendante significative de la viabilité cellulaire (35% et 15% de viabilité résiduelle après respectivement 24h et 48h d'exposition à 0,25 mg/mL de particules) (Figure 54) ainsi qu'une diminution du nombre de cellules adhérentes (données non montrées).



Figure 54 : Cytotoxicité (Test au Bleu Trypan) des particules de fumigène 1 (0 - 0,25 mg/mL) sur cellules A549. La cytotoxicité des particules de fumigène 1 a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées en moyennes \pm écart-type (n=3). * : exposé vs témoin p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. # : différence significative entre concentrations p<0,05, ## p<0,01, ### p≤0,001.

En contraste, aucune cytotoxicité n'a été observée avec le fumigène 4 quelle que soit la concentration en particules, la durée d'exposition ou le test utilisé (MTT et Bleu Trypan) (Figure 55 et 56).



Figure 55 : Cytotoxicité (Test au MTT) des particules de fumigène 4 (0 - 0,5 mg/mL) sur cellules A549. La cytotoxicité des particules de fumigène 4 a été évaluée après 24h (A) et 48h (B) d'exposition. Les données sont exprimées en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées en moyennes ± écarttype (n=3).





Nous observons donc de ces résultats une cytotoxicité différente en fonction du type de fumigène dont sont issues les particules.

3- Évaluation du cycle cellulaire

Nous avons également évalué les modifications de répartition des cellules exposées aux particules de fumigène 1 ou 4 dans les différentes phases du cycle par cytométrie en flux. Après 24h et 48h d'exposition aux particules de fumigène 1 (0,05 et 0,25 mg/mL), nous avons observé une augmentation significative de la proportion des cellules en phase sub G0-G1, correspondant à des cellules mortes (facteur 7,1 après 24h et 3 après 48h à 0,25 mg/mL). Une diminution significative de la proportion des cellules en phase G0-G1 est également observée,

aussi bien après 24h (facteur 2,2 à 0,25 mg/mL) que 48h d'exposition (facteur 1,3 et 2,6 à 0,1 mg/mL et 0,25 mg/mL respectivement). En ce qui concerne les phases S et G2-M, aucune modification n'a été observée (Tableau 27).

A			Phase du cycle cellulaire (cellules en %)					
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M			
	Témoin – 24h	$7,50 \pm 2,7$	76,20 ± 0,9	13,30 ± 1,9	2,86 ± 0,5			
	0,1 mg/mL-24h	16,33 ± 3,8	70,30 ± 2,0	11,00 ± 1,2	$2,23 \pm 0,6$			
	0,25 mg/mL – 24h	52,90 ± 7,5 ***	35,00 ± 7,8 ***	9,68 ± 1,4	$2,20 \pm 0,7$			
В		Phase du cycle cellulaire (cellules en %)						
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M			
	Témoin – 48h	20,13 ± 3,2	72,50 ± 1,9	5,74 ± 1,4	1,47 ± 0,1			
	0,1 mg/mL-48h	35,10 ± 9,2	55,37 ± 7,8 *	7,70 ± 1,3	1,74 ± 0,4			
	0.25 mg/ml - 48 h	60 27 + 11 8 **	27.63 + 6.0 ***	8 14 + 4 2	3 54 + 1 7			

Tableau 27 : Effet des particules du fumigène 1 (0,10 et 0,25 mg/mL) sur les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549.

Les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549 ont été évaluées après exposition aux concentrations de 0,1 et 0,25 mg/mL pendant 24h (A) et 48h (B). Les différentes phases du cycle cellulaire sont identifiées grâce à la technique de la cytométrie en flux et les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules ± écart-type (n=3). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, exposé vs témoin.

Le fumigène 4 n'induit pour sa part aucune modification de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire dans nos conditions d'études (Tableau 28).

A		Phase du cycle cellulaire (cellules en %)					
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M		
	Témoin – 24h	9,93 ± 7,8	72,37 ± 7,2	15,13 ± 0,6	2,52 ± 0,3		
	0,1 mg/mL-24h	29,63 ± 18,9	55,97 ± 15,7	12,02 ± 2,6	2,27 ± 0,9		
	0,25 mg/mL – 24h	28,03 ± 5,6	56,73 ± 5,3	12,70 ± 0,4	2,41 ± 0,2		
В		Phase du cycle cellulaire (cellules en %)					
	Conditions	Sub G0-G1	G0-G1	S	G2-M		
	Témoin – 48h	17,63 ± 2,9	75,87 ± 3,3	$4,76 \pm 0,9$	1,66 ± 0,3		
	0,1 mg/mL-48h	39,33 ± 13,2	55,80 ± 14,5	3,77 ± 1,3	1,09 ± 0,1		
	0.25 ma/mL - 48 h	47.03 + 15.3	48 23 + 16 1	359 ± 07	103 ± 02		

Tableau 28 : Effet des particules du fumigène 4 (0,10 et 0,25 mg/mL) sur les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549.

Les différentes phases du cycle cellulaire des cellules A549 ont été évaluées après exposition aux concentrations de 0,1 et 0,25 mg/mL pendant 24h (A) et 48h (B). Les différentes phases du cycle cellulaire sont identifiées grâce à la technique de la cytométrie en flux et les données sont exprimées en pourcentage moyen de cellules ± écart-type (n=3).

III- Étude de la cytotoxicité des particules de fumigène : influence du mode d'exposition

Dans le but de comparer deux méthodes d'exposition des cellules aux particules des fumigènes 1 et 4, nous avons cultivé les cellules A549 sur insert afin de réaliser des expositions en « pseudo-ALI ». Les cellules A549 ont ainsi été exposées à des concentrations estimées de 0,10 et 0,25 mg/mL dans un milieu de culture contenant 1% de SVF.

Après l'exposition, la cytotoxicité a été évaluée grâce au test de viabilité cellulaire au Bleu Trypan selon le même protocole que celui utilisé après exposition en mode immergé.

L'exposition en mode « pseudo-ALI » aux particules de fumigène 1 a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire avec les deux concentrations utilisées (65% et 58% de viabilité cellulaire obtenue avec les concentrations 0,10 et 0,25 mg/mL de particules) (Figure 57).



Figure 57 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de fumigène 1 (0 – 0,25 mg/mL) sur des cellules A549 en mode « pseudo-ALI ».

La cytotoxicité des particules de fumigène 1 a été évaluée après 30 min d'exposition à l'interface air-liquide suivie de 24h post-exposition en mode immergé aux concentrations estimées de 0,10 et 0,25 mg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules viables par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, exposé vs témoin. Le même protocole a été appliqué pour les particules issues du fumigène 4 et aucune cytotoxicité n'a été observée quelles que soient les concentrations testées (Figure 58).



Figure 58 : Cytotoxicité (Test Bleu Trypan) des particules de fumigène 4 (0 – 0,25 mg/mL) sur des cellules A549 en mode « pseudo-ALI ».

La cytotoxicité des particules de fumigène 4 a été évaluée après 30 min d'exposition à l'interface air-liquide suivie de 24h post-exposition en mode immergé aux concentrations estimées de 0,10 et 0,25 mg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules viables par rapport aux cellules non traitées ± écart-type (n=3). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, exposé vs témoin.

Ces résultats ont été comparés aux résultats précédemment obtenus avec la méthode d'exposition dite « en immergé » (Figures 54 et 56) et il a été observé un profil de cytotoxicité identique, c'est-à-dire une diminution significative de la viabilité cellulaire dès la concentration de 0,10 mg/mL pour les particules du fumigène 1 et une absence de cytotoxicité pour les particules de fumigène 4.

IV- Étude des mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité particulaire.

1- Évaluation du stress oxydant

Différents marqueurs du stress oxydant ont été étudiés lors du master 2 de Claire ROZAY pour les particules de fumigène 1 : les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et l'hème oxygénase 1 (HO-1). Ces enzymes participent toutes au système de défense antioxydant. Ces marqueurs ont été étudiés après exposition des cellules en mode immergé aux concentrations de particules ayant conduit à une cytotoxicité (0,1 et 0,25 mg/mL). L'expression des ARNm a été étudiée par RT-qPCR après 24h d'exposition et après un temps d'exposition plus court (6h).

a. Expression de l'ARNm des superoxydes dismutases

Superoxyde dismutase mitochondriale (Mn SOD)

L'expression de l'ARN messager de la Mn SOD tend à augmenter (facteur 1,91 \pm 0,66) seulement pour la concentration la plus forte (0,25 mg/mL) après 24h d'exposition (Figure 59). Aucune modification n'a été observée au temps le plus court quelle que soit la concentration.



Figure 59 : Expression de l'ARN messager de la Mn SOD après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1 pendant 6 et 24h.

Les résultats sont exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=5).

Superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn SOD)

Aucune modification de l'expression de l'ARNm de la Cu/Zn SOD n'a été observée (Figure 60).



Figure 60 : Expression de l'ARN messager de la Cu/Zn SOD après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1 pendant 6 et 24h. Les résultats sont exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=4).

b. Expression de la protéine superoxyde dismutase mitochondriale

Ayant observé une tendance à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la Mn SOD, son expression protéique a été étudiée par western blot après 24h d'exposition aux particules du fumigène 1 (0,1 et 0,25 mg/mL) (Figure 61). L'étude de l'expression de la bêta-actine et de la glycéraldéhyde-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée afin de normaliser l'expression de la protéine Mn SOD (Figure 61B et C).



Figure 61 : Expression de la Mn SOD.

Quantification de la Mn SOD (A : 25 kDa) associée à son premier contrôle, la protéine de référence GAPDH (B : 37 kDa) et à son deuxième contrôle la bétâ-actine (C : 42 kDa) après exposition aux particules de fumigène 1 pendant 24h à 0,1 et 0,25 mg/mL (n=1 représentatif de trois expérimentations).

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre l'expression de la protéine superoxyde dismutase mitochondriale des cellules A549 témoins et des cellules A549 exposées à 0,1 ou 0,25 mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 24h (Figure 62 et 63).

Mn SOD GAPDH 24h



Figure 62 : Expression de la protéine Mn SOD après exposition de 24h à 0,1et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1.

La GAPDH a été utilisée comme protéine de référence (n=4). Les résultats sont exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type.



Figure 63 : Expression de la protéine Mn SOD après exposition de 24h à 0,1et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1.
 La bêta-actine a été utilisée comme protéine de référence (n=2). Les résultats sont exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type.

Ces résultats confirment l'absence de modification de l'expression de la MnSOD après exposition aux particules de fumigène 1.

c. Expression de l'ARN messager de la catalase

L'expression de l'ARNm de la catalase n'a pas été modifiée après exposition aux particules de fumigène à des concentrations de 0,1 et 0,25 mg/mL, que ce soit après 6 ou 24h d'exposition (Figure 64).



Figure 64 : Expression de l'ARN messager de la catalase après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1 pendant 6h et 24h. Résultats exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=2 avec 2 protéines de référence).

d. Expression de l'ARN messager de l'hème oxygénase 1 (HO-1)

Après une exposition à 0,25 mg/mL de particules de fumigène 1 pendant 6 et 24h, de fortes augmentations de l'ARNm de HO-1 ont été observées, correspondant respectivement à des facteurs $8,5 \pm 4$ et 10,6 ± 4 par rapport au témoin. On observe également une augmentation, plus faible mais toujours significative, après 6h d'exposition à 0,1 mg/mL (facteur $3 \pm 0,3$) alors que ce n'est pas clairement le cas après 24h d'exposition (1,5 $\pm 0,69$) (Figure 65).



Figure 65 : Expression de l'ARNm de l'hème oxygénase 1 (HO-1) après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 6h et 24h. Résultate exprimés en moveme du rapport traité/lémein + écart type (n=4 avec la CAPDH et n=2 avec la bétê

Résultats exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=4 avec la GAPDH et n=2 avec la bétâactine comme protéines de référence) (* : traité/témoin > 2).

2- Évaluation de l'inflammation

Pour évaluer l'inflammation, l'étude de l'expression des ARNm des interleukines-6 et -8 (IL-6 et IL-8) a été réalisée.

a. Interleukine-6 (IL-6)

Après 6h d'exposition à 0,25 mg/mL de particules de fumigènes 1, il a été observé une augmentation des ARNm codant pour l'IL-6 à la limite de la significativité (facteur 2,1 \pm 0,5). Cette augmentation est largement amplifiée après 24h d'exposition (facteur 4,1 \pm 0,15). Aucune différence d'expression n'a été observée après expositions à 0,1 mg/mL de particules, que ce soit pendant 6h ou 24h (Figure 66).



Figure 66 : Expression de l'ARN messager de l'interleukine-6 après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 6h et 24h.

Résultats exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=2, 1 protéine de référence), (* : traité/témoin >2).

b. Interleukine-8 (IL-8)

Une augmentation significative de la quantité d'ARNm a été observée après 24h d'exposition pour les deux concentrations de particules utilisées (facteurs $2,05 \pm 0,22$ et $3,43 \pm 0,82$ respectivement) (Figure 67).



Figure 67 : Expression de l'ARN messager de l'interleukine-8 après exposition à 0,1 et 0,25 mg/mL de particules de fumigènes 1 pendant 6h et 24h.

Résultats exprimés en moyenne du rapport traité/témoin ± écart type (n=4, 1 protéine de référence), (* : traité/témoin > 2).

V- Discussion de l'étude II

Cette étude représente une partie d'un programme de recherche qui vise à développer une méthodologie pour identifier les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des particules de fumées pyrotechniques qui pourraient être responsables d'effets néfastes sur la santé. Les fumigènes ont pour but de produire un nuage particulaire en suspension dans l'atmosphère par le fait d'un temps de sédimentation des particules long. Les particules étudiées proviennent de la combustion d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (F1), de deux fumigènes à but anti-intrusion (F2 et F3) et d'un fumigène à base d'hexachloroéthane (F4). Elles ont été prélevées par deux impacteurs en cascade lors de deux campagnes de prélèvement, en octobre 2014 et juin 2015, au sein du centre d'expérimentation de la DGA. Lors de la deuxième campagne de prélèvement, afin d'améliorer l'évaluation de la granulométrie des particules de fumigènes, deux analyseurs/compteurs de particules en temps réel ont été utilisés. Cette approche a permis de montrer que les fumigènes émettent des particules d'un diamètre aérodynamique inférieur à 1 µm, conformément à la taille de particules retrouvée dans d'autres études²⁰¹. La concentration moyenne des particules émises au cours de la période de collecte a été de 18,7 mg/m³ avec un minimum de 12,7 mg/m³ et un maximum de 26,1 mg/m³ pour l'ensemble des quatre fumigènes.

Afin de déterminer la concentration et la distribution en taille des particules émises par les fumigènes, deux analyseurs en temps réel ont été utilisés et placés à 2 mètres de la source d'émission dans le but d'éviter la saturation des analyses lors de la deuxième campagne de prélèvement. Les données en temps réel des particules de F1 ont montré que leur majorité se situe dans la plage nanométrique (taille comprise entre 150 et 300 nm) avec une concentration moyenne de 7,5.10⁵ particules/cm³ (1,4.10⁶ particules/cm³ cumul de deux tirs) et que ces nanoparticules sont principalement émises dans les 10 min après le déclenchement du fumigène. On note également en fin de tir (à partir de 10 min) une modification de la granulométrie de l'aérosol avec l'apparition de particules de plus grosse taille (entre 1 à 2 µm), ce qui concorde avec le début de la sédimentation de l'aérosol observée lors des tirs. Cette sédimentation pourrait donc être provoquée par l'agrégation de petites particules afin de produire des particules de plus grosse taille. En ce qui concerne F4, les particules émises possèdent également une granulométrie majoritaire nanométrique, comprise entre 150 et 300 nm avec une concentration aux alentours de 5.10⁵ particules/cm³, donc similaire à celle observée pour le F1. La majeure partie des particules nanométriques (150 - 300 nm) est produite dès le début du tir (0 - 5 min) avec également une émission de particules plus grosses (1 µm) en deux vagues successives (de 0 à 5 min et de 5 min à 10 min). Quant aux fumigènes anti-intrusifs (F2 et F3), ils produisent quasiment exclusivement des particules nanométriques (comprises entre 100 et 200 nm) avec une densité particulaire 2 fois plus élevée pour F2 que

pour les autres fumigènes (500 000 particules de 125 nm/cm³ pour F2 contre 150 000 à 200 000 particules de 200 nm/cm³ pour F1, F3, F4). Pour F3, il semble y avoir plusieurs vagues d'émissions de particules tout au long du tir. Cette densité, cette granulométrie ainsi que cette production constante et longue (environ 20 min contre 10 min pour F1 et F4) de particules explique l'utilisation de ces fumigènes comme anti-intrusifs. Ils vont permettre d'obscurcir le champ de vision le plus longtemps possible dans un endroit clos grâce à un temps de suspension prolongé des nanoparticules produites dans l'atmosphère.

L'analyse élémentaire indique que les particules de F1, F2 et F3 sont majoritairement organiques (F1 et F3 : 70% de carbone ; F2 : 21% de carbone) contrairement à F4 qui ne contient que 2% de carbone, ce qui laisse penser que les particules de F4 seraient composées majoritairement de molécules inorganiques, voire d'éléments métalliques. L'analyse des éléments métalliques a révélé la présence de plusieurs éléments communs aux quatre fumigènes comme par exemple le potassium, le soufre ou bien encore l'aluminium. L'analyse des composés organiques indique que les particules des quatre fumigènes sont très différentes. En effet, pour le F1, nous avons pu observer majoritairement des composés appartenant à la famille des naphtalènes, pour le F2 appartenant principalement à la famille du phénanthrène et de l'anthracène, pour le F3 majoritairement des molécules polycycliques avec fonctions oxygénées périphériques appartenant à la famille des triterpénoïdes et pour le F4 des dérivés de l'hexachlorobenzène.

Les particules F2 et F3 ayant un aspect de gel, de pâte durcie après leur récupération sur les impacteurs en cascade, il nous a donc été impossible de les exposer aux cellules A549. Dans ces conditions, nous nous sommes donc focalisés sur les particules F1 et F4 pour les différents tests toxicologiques nécessitant de la matière particulaire.

Dans la littérature, aucun rapport n'a été trouvé concernant des études de toxicité de fumées colorées ayant exactement la même composition que celle utilisée dans notre étude. Il existe un rapport écrit par Owens et Ward²¹¹ sur la toxicité de grenades de fumigène rouge M18 utilisées par l'armée américaine qui avaient comme colorant le 1-méthylamino-anthraquinone. Plusieurs espèces animales ont été exposées à de fortes concentrations de particules (de 1,5 à 18 g/m³) émises par ces grenades fumigènes. Des signes d'irritation des voies respiratoires supérieures et une salivation immédiate ont été observées, avec une concentration létale 50 variant entre 0,4 et 0,6 g/m³ par min. Cette étude est l'une des seules études référencées dans la littérature à s'être attachée à caractériser les produits émis après combustion d'un fumigène. Hemmila et son équipe²⁰¹ ont exposé des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B à différents fumigènes colorés dont un de couleur rouge. Après 5 min d'exposition en ALI à la fumée issue de la combustion d'une pastille de 0,25 g à 1 g du fumigène rouge, il a également

été observé une forte cytotoxicité (61% de mortalité cellulaire avec la pastille de 0,25 g). Les fumigènes de différentes couleurs testés n'ont pas tous induits le même effet cytotoxique (par ordre de réponse toxique croissante : jaune, violet, rouge et orange), ce qui pourrait indiquer qu'une partie de la toxicité observée serait attribuable aux composés responsables de la coloration. Dans notre étude, c'est un dérivé de l'antraquinone (1,2,4-trimethyl anthraquinone), retrouvé à hauteur d'environ 3%, qui donne majoritairement la couleur rouge au fumigène de signalisation F1 et qui pourrait donc jouer un rôle important dans la cytotoxicité observée. Au vu des résultats de l'étude d'Hemmilä et Hihkiö²⁰¹, il est également possible que le CO présent dans les produits de combustion (non mesuré dans cette étude) joue un rôle important dans l'induction de cette toxicité.

Les particules F1 sont majoritairement composées de dérivés du naphtalène (78 % de la composition organique), comme le 2-naphtalenol-1-[(4-methoxyphenyl)azo-), composé ayant une structure moléculaire semblable aux colorants rouge soudan et rouge citrus, ou encore comme le 1-isocyanato-naphtalène. Ayant très peu d'informations sur ces composés, nous nous intéresserons à la famille des naphtalènes. Le naphtalène est considéré comme cancérogène possible pour l'homme, classé par le CIRC dans le groupe 2B, au vu des preuves suffisantes d'études menées chez l'animal. Il induit des adénomes dans la cavité nasale de rats mâles et des neuroblastomes olfactifs après des expositions chroniques à des concentrations d'inhalation de 10 à 60 ppm²⁵¹. Chez le rat, aucune lésion n'a été observée dans l'épithélium pulmonaire pour une exposition aigue par inhalation de vapeur de naphtalène à des concentrations allant jusqu'à 100 ppm pendant 4h. En revanche, l'administration de naphtalène chez la souris par voie intrapéritonéale (200 mg/kg) a provoqué une cytotoxicité des cellules de Clara, limitée aux voies aériennes distales et s'étendant aux bronches lobaires pour des doses plus élevées²⁵². Dans notre étude après exposition aux cellules A549 des particules de F1 composés majoritairement de dérivés de naphtalène, une cytotoxicité a été établie suite aux différents tests biologiques effectués (MTT et Bleu Trypan), démontrant une altération de l'activité métabolique mitochondriale des cellules nécessaire à la prolifération cellulaire ainsi que des mécanismes d'exclusion membranaire, reflet de l'intégrité membranaire de la cellule. Cette cytotoxicité a été confirmée grâce à l'évaluation de la répartition des cellules dans différentes phases du cycle cellulaire, par une augmentation de la proportion des cellules mortes (phase sub G0-G1) au détriment des cellules se situant en phase G0-G1. L'administration intrapéritonéale de naphtalène induit également un fort stress oxydant au niveau des voies aériennes distales (essentiellement bronchioles) par la diminution du glutathion réduit GSH²⁵³. Sachant cela, nous nous sommes intéressés aux enzymes antioxydantes, SOD, catalase et HO-1 ainsi qu'aux cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-6 et I'IL-8 après l'exposition aux particules F1 ayant induit une cytotoxicité. Après analyse, aucune

différence significative de la quantité d'ARNm des superoxydes dismutases cytosoliques (CuZn SOD) et mitochondriales (Mn SOD) et de la catalase n'a été observée. Ces résultats sont confirmés par l'absence de modification d'expression de la protéine Mn SOD. Néanmoins, l'étude de la réponse anti-oxydante est complexe et nécessite la plupart du temps une étude cinétique, ce qui est difficilement réalisable avec les particules de fumigène puisque nous ne disposons que de quantités limitées. De plus, les effets sur la transcription et la traduction des enzymes ne sont pas toujours homogènes et facilement interprétables. En effet, de nombreuses études, dont celle de Chirino et son équipe²⁵⁴, montrent une très faible diminution de la quantité de protéines enzymatiques (CuZn SOD, Mn SOD et catalase) comparée à la forte diminution de leurs activités enzymatiques après 24h d'exposition de cellules A549 à des particules (PM₁₀) à des concentrations n'induisant aucune cytotoxicité. Cette différence entre activité spécifique et expression protéique pourrait s'expliquer par le fait que le peroxyde d'hydrogène, une fois formé, inhiberait certaines enzymes anti-oxydantes comme les superoxydes dismutases²⁵⁵ mais aussi par le fait que certains métaux ou HAPs, souvent adsorbés sur les particules atmosphériques, peuvent interagir directement avec les enzymes anti-oxydantes^{256,257}. N'ayant pu mesurer l'activité spécifique de ces enzymes anti-oxydantes par manque de matière particulaire, il serait donc intéressant d'effectuer ces mesures dans la poursuite de cette étude afin de confirmer ou affirmer cette hypothèse et de lever le voile sur le potentiel rôle que pourraient jouer les différents métaux et HAPs retrouvés dans la composition des particules F1.

L'hème oxygénase, notamment l'isoforme 1 (HO-1), est un puissant anti-oxydant connu pour être inductible lors d'un stress oxydant²⁵⁸. Après une exposition aux particules F1, il a été observé une augmentation importante de l'expression de l'ARNm HO-1, expression concordant avec la littérature où il a été montré que l'expression de HO-1, après exposition de cellules BEAS-2B à des particules ultrafines, était corrélée avec la formation d'espèces réactives de l'oxygène¹⁶⁵. D'autres équipes ont étudié l'expression de HO-1 après exposition à des PM_{2.5}. Après 30 min, 1h et 2h d'exposition à 16 μ g/cm² (0,053 mg/mL) de PM_{2.5}, une forte augmentation de l'expression de HO-1 par les cellules A549 est observée, due à une activation du facteur de transcription Nrf-2²⁵⁹. Il a également été montré que l'exposition de macrophages murins RAW 264.7 à 50 µg/mL de particules issues de moteur Diesel pendant 6h induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm de HO-1 sans modification de l'expression de l'ARNm de la Mn-SOD et de la catalase²⁶⁰. Cette étude a également mis en évidence que l'augmentation de l'expression de Nrf-2 était due à des composés aromatiques comme le phénanthrène et le naphtalène présents dans nos particules de fumigènes ainsi qu'à la fraction polaire contenant des quinones. Il serait donc également intéressant d'évaluer l'expression de Nrf-2 après exposition aux particules de fumigène afin d'en déduire si la

modification de l'expression de Nrf-2 peut être corrélée à la présence de composés aromatiques.

Après les dérivés du naphtalène, ce sont les dérivés du benzenamine que l'on retrouve à hauteur d'environ 11% tels que le 2-methoxy-benzenamine (O-anisidine) ou encore le 2-methyl-4-[(2-methylphenyl)azo]-benzenamine (o-aminoazotoluène). Les benzenamines sont souvent utilisées comme combustibles, produisent des fumées toxiques et irritantes lors d'incendie. L'exposition se fait essentiellement par la peau, les yeux et les muqueuses et par inhalation entraînant des irritations de la peau, des yeux et des voies respiratoires ainsi que des céphalées. Leur inhalation induit la formation de méthémoglobine et de sulfhémoglobine ²⁶¹. Dans les différentes études, il n'a toutefois pas été observé d'augmentation de la mortalité des animaux exposés à ces benzenamines qui sont tout de même considérées comme cancérigènes possibles (classés 2B par le CIRC).

Nos résultats montrent que les extraits organiques issus des particules F1 sont mutagènes vis-à-vis de la souche TA98 seulement après activation métabolique exogène et vis-à-vis de la souche YG1041 avec et sans activation métabolique. Compte tenu des caractéristiques de ces deux souches de Salmonella typhimurium, cette activité mutagène peut être attribuée essentiellement à des composés aminés (mutagénicité indirecte) et dans une moindre mesure, à des composés nitrés (mutagénicité directe). Les analyses chimiques ont montré la présence de diverses molécules organiques aminées, certaines d'entre elles étant connues comme génotoxiques et/ou cancérogènes classées par le CIRC, comme par exemple des dérivés de la famille des benzenamines, que sont l'O-toluidine (groupe 1), l'O-anisidine (2methoxybenzenamine) (groupe 2B) ; ou bien encore des dérivés de la famille des naphtalènes (groupe 2B)²⁶². Le composé organique principal identifié est le 1[(4-methoxyphenyl)azo-]-2naphtalénol ou un composé dérivé avec une structure moléculaire semblable au rouge soudan ou rouge citrus, le 2(1-(2,5-diméthoxy-phénylazo) naphtalène-2-ol. Ces composés azoïques peuvent être métabolisés et clivés par les bactéries en composés nitrés ou aminés. Les particules seraient également capables d'inhiber les processus de réparation de l'ADN favorisant la mutagenèse²⁶³. Nous avons également trouvé d'autres constituants comme des métaux ainsi que des quinones qui sont capables d'induire la production d'EROs par le cycle d'oxydo-réduction cellulaire, pouvant provoquer l'apparition d'un stress oxydant dans les poumons des animaux²⁶⁴ ainsi que le déclenchement d'une réponse inflammatoire à travers la sécrétion de plusieurs cytokines/chimiokines dans les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B²⁶⁵. En effet, selon les travaux de Shang et son équipe, les dérivés de quinones (présents sur les PM) notamment le 1,4-naphthroquinone et le 9,10-anthraquinone, induiraient sur des cellules épithéliales bronchiques A549, des dommages de l'ADN et participeraient donc à la sécrétion des chemokines/cytokines pro-inflammatoires²²⁵. Cette

supposition s'est vérifiée dans notre étude puisqu'après 24h d'exposition aux particules F1, il a été observé une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8. L'équipe de Vattanasit²⁶⁶, a également observé une augmentation dose dépendante de l'expression de l'IL-6 et l'IL-8 par des cellules A549 exposées pendant 24h à des particules d'origine urbaine, pour des doses plus faibles que celles utilisées dans notre étude (0,025 mg/mL à 0,1 mg/mL). Une augmentation de l'expression de l'IL-8 a également été observée après 24h d'exposition à une gamme de $PM_{2.5}$ allant de 0,2 mg/mL à 1mg/mL²¹⁷, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'IL-6, l'IL-8 et du TNF-α par des cellules A549 après exposition à 0,25 mg/mL²⁶⁷. Suite à une atteinte tissulaire, une réponse inflammatoire peut se mettre en place impliquant notamment la production et le recrutement de cytokines pro-inflammatoires. La production de ces cytokines est induite par des facteurs de transcription comme NF-kB et AP-1 qui sont eux même stimulés en présence d'EROs^{123,268}. L'induction du TNF-α, de l'IL-8 et de MCP-1 participe à l'infiltration du tissu pulmonaire par des cellules mononuclées pouvant entraîner à terme une fibrose, comme observé lors de l'exposition in vivo aux fumigènes à base d'HC/Zn¹⁹⁹. Les cellules A549 cultivées dans nos conditions expérimentales expriment peu de TNF- α . Par conséquent, nous n'avons pu détecter l'expression de l'ARNm de ce dernier. Nous avons observé que les particules F1 peuvent induire ou tout du moins initialiser une réponse inflammatoire au niveau de l'épithélium alvéolaire.

En ce qui concerne la composition organique du F4 à base d'hexachloroéthane, aucune molécule d'hexachloroéthane n'a été retrouvée au sein des particules prélevées après le tir du fumigène. En effet, les particules F4 ne comportent qu'une faible portion organique (2%), composée à hauteur de 70% d'hexachlorobenzène issu directement de la combustion de l'hexachloroéthane. Malgré le manque de données chez l'homme, l'hexachlorobenzène est considéré comme un composé cancérogène possible, classé dans la catégorie 2B par le CIRC, du fait des différents tests effectués sur l'animal, principalement sur le rat, la souris et le cochon d'Inde²⁶⁹. Ces données sont également confirmées par les résultats de Marrs et son équipe qui ont observé une augmentation significative de la fréquence et de la prévalence des carcinomes alvéolo-bronchiques accompagnée d'une variété de signaux inflammatoires au niveau pulmonaire chez les souris après exposition aux fumées issues de la combustion de fumigène à base d'hexachloroéthane, d'oxyde de titane et de zinc^{204,270}. Ce composé a longtemps été utilisé comme fongicide dans le domaine agricole avant d'être interdit du fait de ses effets cancérigènes. Il a également la capacité de s'accumuler dans les tissus riches en lipides, tels que le tissu adipeux, le cortex surrénalien, la moelle osseuse et de cibler la biosynthèse de l'hème induisant de nombreux cas de porphyrie²⁶⁹. Malgré ses effets cancérigènes chez l'animal, aucun effet cytotoxique et mutagène de l'hexachlorobenzène n'a été clairement démontré dans la littérature chez l'homme^{271,272}. Cette absence d'effet mutagène est en accord avec les résultats obtenus dans notre étude. En effet, nous n'avons observé aucun effet mutagène. En se référant à l'ensemble des connaissances sur l'hexachloroéthane ainsi que son produit de combustion majoritaire l'hexachlorobenzène, aucun effet mutagène n'a été relevé dans la littérature en utilisant le test d'Ames. L'hexachlorobenzène est connu comme ayant une faible capacité à induire directement une mutation génique, des lésions chromosomiques ainsi que la réparation de l'ADN²⁷⁰. Dans la littérature, il a été supposé que les particules de fumée de dioxyde de titane/hexachloroéthane puissent contenir un agent mutagène en très petite quantité, insuffisante pour induire des effets significatifs avec le test d'Ames. L'hexachloroéthane est tout de même considéré comme cancérogène possible, classé 2B, induisant une augmentation de la fréquence d'apparition de carcinomes alvéolaires chez la souris, qui seraient essentiellement d'origine épigénétique et non mutagène²⁷⁰.

Au niveau de la composition des particules F4, nous retrouvons en seconde position des composés organiques et en proportion quasi-identique, l'octachloroacénaphtylène (11%) et l'octachloronaphtalène (10%). Ces composés naphtaléno-chlorés sont essentiellement utilisés comme matériaux étanches isolant les câbles électriques en les protégeant de l'humidité ou encore comme séparateur dans les batteries. Dans les grenades fumigènes, ces chloro-naphtalènes vont permettre la séparation des différents composés présents avant leur combustion. Seuls quelques cas d'expositions à ces composés ont été référencés dans les années 1930 chez les travailleurs en charge de la manutention de câbles électriques. Des réactions cutanées sévères appelées chloracnés ont été rapportées après des expositions professionnelles chroniques par inhalation. Lors d'expositions aigües à ces vapeurs, une insuffisance hépatique aigüe peut venir s'ajouter dans les plus graves cas²⁷³.

En plus petite quantité, on retrouve également des résidus de différents phtalates, couramment utilisés comme plastifiants (en particulier du PVC) pour les rendre souples. Les phtalates retrouvés dans les particules proviendraient donc de l'emballage du fumigène, de la grenade elle-même et seraient libérés lors de la combustion. L'inhalation ou l'ingestion des phtalates en concentration relativement élevée est considéré comme toxique, pouvant provoquer chez le rat et la souris une baisse de la fertilité, des malformations chez le fœtus, des effets perturbateurs endocriniens et cancérogènes, principalement au niveau du foie²⁷⁴. Contrairement aux particules de F1, aucune cytotoxicité n'a été observée après exposition aux particules de F4 à base d'hexachloroéthane.

Après avoir évalué les mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité particulaire par la méthode d'exposition en immergée, nous nous sommes intéressés à la méthode d'exposition à l'interface ALI afin de mimer les conditions expérimentales les plus proches
possible d'une exposition par inhalation. Les cellules A549 ont donc été exposées par la méthode d'exposition « pseudo-ALI » dans les mêmes conditions de temps et de concentrations que les particules de tir précédemment décrites.

Après exposition, nous avons donc observé une diminution significative de la viabilité cellulaire pour les particules F1, contrairement aux particules F4. Le profil cytotoxique résultant de l'exposition en mode « pseudo-ALI » à ces particules est extrêmement proche des profils obtenus en mode immergé, c'est-à-dire une diminution significative de la viabilité cellulaire aux mêmes concentrations (0,1 et 0,25 mg/mL) pour les particules F1 et une absence de modification de cette viabilité cellulaire pour les particules F4.

Dans la littérature, il n'existe aucune étude référencée de ce genre, où des particules issues de fumigène ont été remises en suspension dans l'air grâce à un dispositif de nébulisation afin d'exposer des cellules pulmonaires à l'interface ALI. Cependant, il existe quelques études utilisant des particules métalliques à base de cuivre par exemple, qui induisent une cytotoxicité sur cellules A549 et SAEC (culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires humaines) à des concentrations nébulisées de l'ordre de 0,010 à 0,050 mg/cm² comparables à celles que nous avons utilisé (pour rappel : 0,10 mg/mL correspond à 0,030 mg/cm² et 0,25 mg/mL à 0,075 mg/cm²)²⁷⁵. Panas et son équipe ont également testé les effets des deux méthodes d'expositions, sur les cellules A549 avec deux types nanoparticules de silice amorphe à des concentrations situées entre 0,015 et 0,100 mg/cm² ²³⁵. Ces deux types de nanoparticules ont induit une cytotoxicité significative dans les conditions immergées et ALI. Toutefois, l'exposition immergée occasionnerait des effets plus marqués à des doses plus faibles. Ces résultats démontrent la faisabilité et la sensibilité du système d'exposition pour tester les effets cytotoxiques des composés particulaires issus de l'environnement directement sur des cellules respiratoires humaines.

Conclusion et perspectives

Cette étude exploratoire avait pour objectif d'apporter des connaissances sur la composition ainsi que sur la toxicité pulmonaire *in vitro* de particules émises lors d'activités pyrotechniques, et plus précisément des particules issues d'armes de petit calibre et de fumigènes.

Afin d'atteindre ces objectifs, des moyens de prélèvements *in situ* (impacteurs en cascade) ont été mis en œuvre, grâce à la collaboration avec le CCM de Dunkerque, lors de séances d'entraînement de tirs et lors de tirs d'essai de quatre fumigènes différents. Par la suite, les caractéristiques physico-chimiques des différents types de particules prélevées ont été déterminées, notamment la granulométrie et la composition en éléments organiques et inorganiques. Nous avons ainsi pu observer que les particules de tir présentaient une granulométrie assez grossière, ayant majoritairement un diamètre aérodynamique compris entre 3 et 7,5 µm, contrairement aux particules de fumigènes, qui elles présentaient majoritairement une granulométrie inférieure à 1 µm. Grâce à la pesée des échantillions prélevés par les impacteurs en cascade ainsi qu'à la mesure des temps de prélèvement, les concentrations atmosphériques particulaires moyennes ont également pu être déterminées, permettant de mettre en évidence que les fumigènes généraient de très grandes quantités de particules, quantités grandement supérieures à celles générées par une séance de tirs de petit calibre, avec une teneur atmosphérique moyenne de 18,7 mg/m³ pour les quatre fumigènes contre 0,284 mg/m³ pour les séance de tirs d'armes de poing.

La composition chimique des différentes particules présente de très grandes disparités, que ce soit entre les particules de tir et de fumigènes qu'entre les différents fumigènes. En effet, les particules de tir présentent une composition principalement métallique, avec le plomb comme élément majoritaire tandis que les particules de fumigènes sont, de manière générale, majoritairement composées de molécules organiques. Il existe également de grandes disparités en termes de composés organiques entre les quatre fumigènes analysés, avec des familles de composés majoritaires totalement différents, comme par exemple les naphtalènes pour le F1, les phénanthrènes et anthracènes pour le F2, des composés polycycliques pour le F3 et enfin l'hexachlorobenzène pour le F4.

Dans un second temps, l'analyse toxicologique des particules a été initiée sur un modèle de cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549). L'évaluation de la cytotoxicité globale grâce à la méthode MTT (activité mitochondriale) et Bleu Trypan (mécanismes d'exclusion membranaire) ainsi que l'évaluation des modifications du cycle cellulaire par cytométrie en flux ont été effectuées sur les deux familles de particules. Il a ainsi été observé que les particules de tir et du F1 provoquent une altération de la division cellulaire ainsi que des perturbations de la perméabilité membranaire et de l'activité mitochondriale. La mutagénicité des extraits

organiques préparés à partir des particules des quatre fumigènes a également été évaluée par le test d'Ames et il a été observé des effets mutagènes marqués avec le F1.

Par la suite, une évaluation des mécanismes d'action sous-jacents de cette toxicité, notamment la formation des lésions oxydatives et la production des cytokines inflammatoires a été réalisée pour les particules du F1. Nous avons ainsi pu montrer l'induction d'un stress oxydant (augmentation importante de l'expression de l'ARNm de HO-1) et l'initiation d'une réponse inflammatoire caractérisée par la sécrétion de cytokines (augmentation de l'expression de l'ARNm d'IL-6 et IL-8). Ces mécanismes pourraient être causés par une production excessive d'EROs en réponse aux réactions d'oxydo-réduction catalysées par des métaux de transition et/ou par des composés organiques adsorbés aux particules. Afin d'établir la relation entre le stress oxydant et la réponse inflammatoire, une étude approfondie de l'activation du facteur de transcription NF-k β , connu pour son implication dans la régulation de ces deux mécanismes, pourrait être réalisée.

Afin de compléter cette investigation *in vitro*, nous nous sommes intéressés à la méthode d'exposition à l'interface ALI, permettant de se rapprocher des conditions réelle d'une exposition par inhalation. Les cellules A549 ont donc été exposées par la méthode d'exposition « pseudo-ALI » aux particules de tir et aux fumigènes 1 et 4 et la cytotoxicité a ensuite été évaluée par la méthode du Bleu Trypan. Les résultats obtenus sont identiques à ceux observés après exposition en immergé.

La culture biphasique des cellules des voies respiratoires en ALI en combinaison avec l'exposition en immergée permet donc l'analyse des effets cellulaires de particules dans des conditions proches de la physiologie respiratoire. Malgré tout, ce modèle d'exposition in vitro n'utilisant qu'un seul type cellulaire peut être limité par le fait qu'il ne prend pas toujours en compte les paramètres biologiques et physiologiques telle que par exemple la coopération entre les cellules épithéliales et des cellules immunitaires (cellules dendritiques, les macrophages), interaction essentielle dans le développement de la pathogenèse cytotoxique et inflammatoire. Ces paramètres pourraient être pris en compte avec l'utilisation d'un modèle cellulaire de co-culture, de cellules épithéliales alvéolaires et de cellules macrophagiques, permettant d'approcher au plus près la physiologie respiratoire humaine. Le prototype que nous avons utilisé n'ayant qu'un seul emplacement pour un insert au centre de la chambre d'exposition, les pertes particulaires sur les parois ainsi qu'autour de l'insert sur le socle sont importantes. Il serait donc intéressant d'utiliser un appareil VITROCELL® possédant 6 ou 12 puits, permettant une meilleure efficacité et productivité d'exposition. La présence d'une microbalance intégrée à cet appareil permettrait également une mesure beaucoup plus précise de la quantité de particules se trouvant en contact avec les cellules dans chaque insert. Ce système permettrait donc l'analyse de mélanges complexes générés synthétiquement ou encore de polluants atmosphériques prélevés dans des conditions intérieures et extérieures.

Cette évaluation des effets toxiques des particules issues de fumigènes, a permis d'appréhender d'une part, les différents moyens à mettre en place afin d'effectuer des prélèvements particulaires lors de tirs de fumigènes en milieu semi-ouvert permettant par la suite une caractérisation physico-chimique détaillée. D'autre part, nous avons mis au point et déterminé les différents tests permettant de statuer sur la toxicité des particules émises par des fumigènes, celles-ci pouvant être potentiellement inhalées lors de leur utilisation par le personnel militaire et civil.

Les résultats obtenus confirment les données de la littérature qui suggèrent que les effets sanitaires néfastes causés par les particules atmosphériques ainsi que celles issues de monde de la pyrotechnie sont partiellement déterminés par leur granulométrie, par leur composition chimique organique ainsi que par leurs propriétés oxydantes et inflammatoires intrinsèques.

Ce travail s'inscrit par ailleurs dans un contexte plus large de pollution particulaire atmosphérique croissante au niveau mondial. Il en ressort la nécessité de pouvoir évaluer au moyen de systèmes expérimentaux adaptés et pertinents, l'impact sanitaire sur les populations et les écosystèmes. Ces données doivent contribuer à terme à l'élaboration ou à la révision de la règlementation.

VALORISATION

Communications affichées :

Journée de l'école doctorale de Rouen EdNBISE (Rouen 26-27 Mars 2015) :

Caractérisation et évaluation toxicologique de fumigènes et des fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre : étude comparative.

<u>M. Mekki</u>, C. Corbière, F. Cazier, D. Dewaele, V. André, J-U. Mullot, H. Fedou, M. Roger, C. Maisonneuve et C. Monteil.

Communications orales :

Journée de l'école doctorale de Rouen EdNBISE (Rouen 26-27 Mars 2015) :

Caractérisation et évaluation toxicologique de fumigènes et des fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre : étude comparative.

<u>M. Mekki</u>, C. Corbière, F. Cazier, D. Dewaele, V. André, J-U. Mullot, H. Fedou, M. Roger, C. Maisonneuve et C. Monteil.

Communication orale, 41^{ème} Congrès International EuroPyro, Toulouse 2015 :

Characterization and toxic assessment of smoke aerosols and aerosols produced by firing small caliber ammunition: a comparative study.

<u>M. Mekki</u>, C. Corbière, F. Cazier, D. Dewaele, V. André, J-U. Mullot, H. Fedou, M. Roger, C. Maisonneuve and C. Monteil.

Groupe de travail SCI-273 à l'OTAN STO-CSO "Guidelines for Toxicity Testing of Smokes, Obscurants, and Pyrotechnic Mixtures" (Neuilly, 28 Avril 2015) :

Characterization and toxic assessment of smoke aerosols and aerosols produced by firing small caliber ammunition: a comparative study.

<u>M. Mekki</u>, C. Corbière, F. Cazier, D. Dewaele, V. André, J-U. Mullot, H. Fedou, M. Roger, C. Maisonneuve and C. Monteil.

Un rapport est actuellement en cours d'élaboration.

Publications :

En lien avec ce travail :

Toxicological and physico-chemical characterizations of pyrotechnic smoke particles : an example from a red signaling smoke.

<u>M. Mekki</u>, C Rozay, C. Corbière, C. Logie, F. Cazier, D. Dewaele, H. Fedou, C. Maisonneuve, V. André, C. Monteil.

En préparation

Autres publications :

Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles. (Free Radic Res. Mars 2015)

Crochemore C, <u>Mekki M</u>, Corbière C, Karoui A, Noël R, Vendeville C, Vaugeois JM, Monteil C.

Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. (Angiogenesis. Avril 2015)

Barbay V, Houssari M, <u>Mékki M</u>, Banquet S, Edwards-Lévy F, Henry JP, Dumesnil A, Adriouch S, Thuillez C, Richard V, Brakenhielm E.

ANNEXES

			Masse c	ollectée (n	ng)		Durée	Volume total prélevé par Concer		
Ensemble de prélèvement	Etage 2	Etage 3	Etage 4	Etage 5	Etage 6	Total collecté sur plaques	totale de prélèvement <mark>(</mark> heure)	les deux ensembles de prélèvement (m3)	de l'aerosof prélevé sur impacteur (µg/m3)	
n°1 (2014)	37,7	30,8	5,0	2,3	0,0	75,8	2.22	271.0	507.4	
n°2 (2014)	105,0	6,8	0,6	0,5	0,0	112,9	2,52	571,2	507,4	
n°1 (2015)	165,8	61,5	11,4	4,0	1,0	243,6	12.22		244.6	
n°2 (2015)	206,1	62,6	3,0	1,0	1,0	273,9	15.22	2 115,4	244,0	

Annexe 1 : Ensemble des données granulométrique par mesure pondérale des prélèvements de particules de tir.

						Masse c	collectée (mg)				-	Volume total	Concentration
			2	Prél	èvement p	ar impact	ion	8	u		Duree rotate	prélevé par les deux ensembles	de l'aérosol nrélevé sur
Fumigène	Date	Etage 2	Etage 3	Etage 4	Etage 5	Etage 6	Total collecté sur plaques	Back-up	Preteven f	eur torai sur litre	prélévement (heure)	de prélèvement (m3)	impacteur (µg/m3)
	14/10/2014	0'0	0'0	31,2	163.8	182,1	377,1	221,2	6,17	cellulose		0 03	000 66
Fumigène	14/10/2014	0.0	0'0	17.5	279,9	73.5	370,9	245,6	20,9	cellulose	دد,0	8 ,2C	800 57
Funcol	03/06/2015			Uh.	ı seul impa	cteur utilis	e,		22,3	cellulose	0.00		
	03/06/2015	0'0	3,4	45,5	165,4	137,0	351,3	222,0	119,0	quartz	دد,0	42,1	13 43/
	15/10/2014	0'0	6'0	1,8	20,9	139,9	163,5	793,5	133.2	cellulose	CL V	6 2 1 1	15 562
Fumigène	15/10/2014	0'0	2,6	0,8	7,8	41.1	52,3	816,8	257,7	quartz	c/'n	C/11	COC CT
2 * Stopy	02/06/2015	0'0	0'0	0'0	0'0	11,2	11,2	247,6	63,4	cellulose		L NC	301 11
	02/06/2015	0'0	0'0	0'0	4,0	14,9	18,9	318,6	137,9	quartz	77.0	54,7	C81 / I
	16/10/2014	0'0	0,2	58,0	303,6	599,2	961,0	415,5	167,6	cellulose	CE O		20102
Fumigène	16/10/2014	0'0	2,5	27,4	437,5	517,8	985,2	634,5	319,3	quartz	0,12	114./	20 130
5 FumiCube	03/06/2015	0'0	0,0	5,0	55,6	78,2	138,8	151,0	20,6	cellulose	57 Q	60.3	102.01
	03/06/2015	0.0	1,8	21,9	144,0	141,5	309,2	280,5	93,2	quartz	C+50	C.60	160 71
Fumigène	02/06/2015 03/06/2015	7,3	2,6	6'0	46,7	0'0	57,5	382,8	104,1	cellulose	OF 0	0.011	00000
4 (HC) *	02/06/2015 03/06/2015	35,2	13,6	315,5	775,0	465,7	1605,0	291,2	581,1	quartz	0, ,0	112,0	709 07
*aérosol trè	s liquide		*	chute du (dispositif	de prélève	ement pendant	le troisième	Er.				

Annexe 2 : Ensemble des données granulométrique par mesure pondérale des prélèvements de particules des quatre fumigènes.



Annexe 3 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 1 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (Deux tirs successifs).



Annexe 4 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 1 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (Cumul des deux essais).



Annexe 5 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 2 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (1 seul tir).



Annexe 6 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 2 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (1 seul tir).



Annexe 7 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 3 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (Deux tirs successifs).



Annexe 8 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 3 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (Cumul des deux essais).



Annexe 9 : Évolution dans le temps du nombre de particules du fumigène 4 par classe granulométrique par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (1 seul tir).



Annexe 10 : Quantité cumulée d'aérosol issu du fumigène 4 par classe granulométrique mesurée par l'analyseur (A) SMPS (de 10 à 400 nm) et (B) OPS (de 300 nm à 10 μm). (1 seul tir).

RT (min)	Peak Name	Amt (% d'aire) ¹	Area	CAS
4.723	Benzenamine, 3-methyl-	0,905	1,07E+07	108-44-1
4.832	o-Toluidine	0,145	1,71E+06	95-53-4
5.443	Benzenamine, 2-methoxy- ou -4-methoxy	10,53	1,25E+08	90-04-0
8.412	2-Methoxyformanilide	0,329	3,89E+06	5470-34-8
9.002	2-Naphthalenol	0,477	5,64E+06	135-19-3
9.450	Naphthalene, 1-isocyanato- OU Benz[cd]indol- 2(1H)-one	3,771	4,46E+07	86-84-0
10.973	2-Hydroxycarbazole	0,489	5,79E+06	86-79-3
13.793	Diazene, bis(2-methylphenyl)-	0,424	5,01E+06	584-90-7
15.970	Dibutyl phthalate	0,225	2,66E+06	84-74-2
19.607	Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan ou benzoxanthene	0,826	9,77E+06	200-23-7
19.842	Anthraquinone, 1,2,4-trimethyl-	3,412	4,03E+07	20153-30-4
21.048	11H-Benzo[a]fluoren-11-one, 10-methyl-	0,138	1,64E+06	54811-45-9
21.948	Benzenamine, 2-methyl-4-[(2- methylphenyl)azo]-	1,599	1,89E+07	97 - 56 - 3
24.941	1,4-Naphthalenedione, 3-acetyl-2,5,7- trihydroxy	0,184	2,17E+06	54725-01-8
30.909	Naphthalene-1,2(1H,2H)-dione, 1-(3-metho	73,01	8,63E+08	100903-60-4

Annexe 11 : Composition en matière organique (GC/MS) des particules issues du fumigène 1. (Campagne de prélèvement 1). (1) Amount (% d'aire) : abondance (en pourcentage d'aire de pic) du composé présent sur le chromatogramme par rapport aux autres composés détectés durant l'analyse.

		%d'aire	aire	CAS
33.616	1,1'-Biphenyl, 3-(1-methylethyl)-	0,243	5,02E+06	20282-30-8
34.102	4a-Methyl-1-methylene-1,2,3,4,4a,9,10,10	0,127	2,63E+06	53084-68-7
34.341	Phenanthrene ou anthracene	0,399	8,25E+06	246-02-6
34.564	1,1'-Biphenyl, 3,4-diethyl-	0,17	3,51E+06	61141-66-0
34.667	Naphthalene, 6-methoxy-2-(1-buten-3-yl)-	0,437	9,02E+06	101327-54-2
34.834	Phenanthrene, 9,10-dihydro-1-methyl-	0,217	4,49E+06	95676-48-5
35.046	1,1'-Biphenyl, 4-(1-methylethyl)-	0,736	1,52E+07	7116-95-2
35.248	9H-Fluorene, 2,3-dimethyl-	0,295	6,09E+06	4612-63-9
36.337	4-Phenanthrenol, 1,2,3,4-tetrahydro-4-me	0,896	1,85E+07	77536-58-4
36.482	4b,8-Dimethyl-2-isopropylphenanthrene, 4	0,793	1,64E+07	None
36.794	Phenanthrene, 4-methyl-	0,7	1,45E+07	832-64-4
37.261	Phenanthrene, 2-methyl-	2,165	4,47E+07	2531-84-2
37.373	1,1'-Biphenyl, 3,4-diethyl-	0,513	1,06E+07	61141-66-0
37.976	Ethanone, 1-[4-(2-phenylethenyl)phenyl]-	0,839	1,73E+07	06/03/3112
38.142	Benzene, 1,3,5-triethenyl-2,4,6-triethyl	0,771	1,59E+07	84679-58-3
38.285	4b,8-Dimethyl-2-isopropylphenanthrene, 4	1,144	2,36E+07	None
38.355	Octahydromethylethylphenanthrene	0,888	1,83E+07	None
38.760	Benzene, 1,3,5-triethenyl-2,4,6-triethyl	0,669	1,38E+07	84679-58-3
39.004	Octahydrodiméthylphenanthrene	7,498	1,55E+08	
39.558	9,10-Dimethylanthracene	1,299	2,68E+07	781-43-1
39.965	Anthracene, 9-(1-methylethyl)-	1,872	3,87E+07	1498-80-2
40.319	9H-Fluorene, 9-butyl-9-methyl-	1,156	2,39E+07	42348-92-5
40.466	10,18-Bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaene	10,12	2,09E+08	6566-19-4
40.707	No Match	1,253	2,59E+07	None
41.031	10,18-Bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaene	0,961	1,99E+07	6566-19-4
41.097	10,18-Bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaene	0,079	1,64E+06	6566-19-4
41.114	10,18-Bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaene	0,185	3,81E+06	6566-19-4
41.468	Phenanthrene, 2,3,5-trimethyl-	1,049	2,17E+07	3674-73-5
41.632	1-[4-(2-p-Tolylvinyl)phenyl]ethanone ?	2,669	5,51E+07	None
41.682	1-[4-(2-p-Tolylvinyl)phenyl]ethanone ?	2,607	5,39E+07	None
41.805	Anthracene, 9-butyl-1,2,3,4-tetrahydro-	0,727	1,50E+07	None
41.867	1-[4-(2-p-Tolylvinyl)phenyl]ethanone ?	1,319	2,72E+07	None
42.068	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)	0,711	1,47E+07	483-65-8
42.186	Benzylnaphtalène ou naphtalene-2-phénylméthyl	0,538	1,11E+07	138089-70-0
42.561	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)	9,572	1,98E+08	483-65-8
43.006	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)	1,008	2,08E+07	483-65-8
43.247	No Match	1,362	2,81E+07	None
43.498	Octahydrodiméthylmethyléthylphenanthrene	4,176	8,63E+07	13601-88-2
43.793	dimethyl-phenyl-naphtalene	2,283	4,72E+07	42758-88-3
44.192	8-IsopropyI-1,3-dimethylphenanthrene	0,608	1,26E+07	135886-06-5
47.984	Derivé Octahydro-alkyls-phenanthrene	2,408	4,97E+07	None
54.640	No Match	0,115	2,38E+06	None

Annexe 12 : Composition en matière organique (GC/MS) des particules issues du fumigène 2. (Campagne de prélèvement 1). (1) Amount (% d'aire) : abondance (en pourcentage d'aire de pic) du composé présent sur le chromatogramme par rapport aux autres composés détectés durant l'analyse.

RT (min)	Peak Name	Amt	Area	CAS Number	Formule
6.403	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	0,163	4,13E+07	499-75-2	
6.888	Limonene-1,2-epoxide(fr.1)	0,159	4,02E+07	None	1
7.373	1,2,3,4,5-Cyclopentanepentol	0,102	2,59E+07	56772-25-9	
7.770	3-Cyclopentene-1-acetaldehyde, 2,2,3-tri	0,142	3,60E+07	4501-58-0	
8.782	1,6-AnhydrobetaD-glucopyranose (levo	0,219	5,53E+07	498-07-7	
8.923	Cubenol	0,184	4,66E+07	21284-22-0	
9.945	Acetate, (2,4a,5,8a-tetramethyl-1,2,3,4,	0,33	8,35E+07	20558-21-8	
10.119	1R,4S,7S,11R-2,2,4,8-Tetramethyltricyclo	0,146	3,69E+07	None	
10.332	Cubenol	0,231	5,83E+07	21284-22-0	
10.677	.alphaCedrene oxide	0,101	2,55E+07	None	
10.763	.tauCadinol	0,441	1,12E+08	01/11/5937	
11.030	2-Naphthalenemethanol, decahydro- .alpha.	0,205	5,19E+07	473-15-4	
11.230	2,5-Octadecadiynoic acid, methyl ester	0,197	4,98E+07	57156-91-9	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
13.439	10,18-Bisnorabieta-8,11,13-triene	0,209	5,29E+07	32624-67-2	
14.276	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-meth	0,304	7,70E+07	84-69-5	
15.007	1-Naphthalenol, 5,6,7,8-tetrahydro-2,5-d	0,171	4,33E+07	55012-72-1	
15.969	Dibutyl phthalate	0,184	4,65E+07	84-74-2	
16.130	I-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	0,296	7,48E+07	28474-90-0	
17.853	9,10-Dimethylanthracene	0,11	2,77E+07	781-43-1	
19.546	1-Heptatriacotanol	0,18	4,55E+07	105794-58-9	
19.809	2,2,4-Trimethyl-3-(3,8,12,16-tetramethyl	1,914	4,84E+08	None	
35.321	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	0,194	4,91E+07	33055-28-6	i,ct9P
35.515	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	5,768	1,46E+09	33055-28-6	
36.317	Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	10,76	2,72E+09	20475-86-9	
36.369	Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	4,058	1,03E+09	20475-86-9	. will
36.389	Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	2,823	7,14E+08	20475-86-9	don -
36.537	Urs-12-en-24-oic acid, 3-oxo-, methyl ester	0,667	1,69E+08	20475-86-9	
36.973	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	0,172	4,35E+07	33055-28-6	
38.855	Ursa-9(11),12-dien-3-ol	0,545	1,38E+08	41753-44-0	

39.311	4.4.6a.6b.8a.11.11.14b-Octamethyl-1.4.	0,542	1,37E+08	None	Ň
39.336	4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a	0,141	3,57E+07	None	6X
39.448	Ursa-9(11),12-dien-3-one	1,3	3,29E+08	72093-24-4	
39.538	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a 5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a	0,152	3,86E+07	None	
39.685	Ursa-9(11),12-dien-3-ol	1,336	3,38E+08	41753-44-0	
40.044	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a 5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a	4,534	1,15E+09	None	
40.241	.betaAmyrin	2,638	6,67E+08	559-70-6	
40.473	.betaAmyrin	0,658	1,67E+08	559-70-6	
40.739	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	3,443	8,71E+08	33055-28-6	° C C C C C C C C C C C C C C C C C C C
40.897	.alphaAmyrin	2,236	5,65E+08	638-95-9	
41.007	Lupeol	5,839	1,48E+09	545-47-1	
41.162	.alphaAmyrin	1,487	3,76E+08	638-95-9	$\rightarrow \gamma \gamma$
41.277	.betaAmyrin	2,113	5,35E+08	559-70-6	tor
41.586	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	0,203	5,15E+07	33055-28-6	
42.148	4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-Octamethyl-1,4,4a 5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a	0,16	4,06E+07	None	
42.426	12-Oleanen-3-yl acetate, (3.alpha.)-	0,24	6,07E+07	33055-28-6	
44.186	Acetic acid, 4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-	0,551	1,39E+08	None	~ ° °
44.794	octamethyl-14-oxo-1,2,3,4,4ª,5,6ª,6b,7,8	0,118	2,98E+07	None	O H .

Annexe 13 : Composition en matière organique (GC/MS) des particules issues du fumigène 3. (Campagne de prélèvement 1). (1) Amount (% d'aire) : abondance (en pourcentage d'aire de pic) du composé présent sur le chromatogramme par rapport aux autres composés détectés durant l'analyse.

				Ai	res <mark>de pic</mark>	
RT (min)	Nom	Nº CAS	backup	Particules libres	Filtre quartz	Filtre quartz concentré
8.715	Pentachlorobenzene *	j.		0		5,28E+06
11.417	Benzene, hexachloro- *	118-74-1	1,78E+07	2,87E+07	3,58E+07	1,83E+09
12.883	alcane	630-04-6	- C)			2,07E+07
13.931	phtalate	17851-53-5		i)		4,03E+07
15.628	phtalate	17851-53-5				2,41E+07
17.088	Octachlorostyrène (Benzene, pentachloro(trichloroethenyl)-) *	29082-74-4	679129	525 <mark>8</mark> 27	346903	2,39E+07
18.350	10,18-bisnorabieta-5,7,9(10),11,13- pentaene *	6566-19-4				1,58E+07
20.578	méthyl-méthyléthyl-phénanthrène *	483-65-8		Ĵ.		3,77E+07
22,877	1-phenanthrenecarboxylic acid	1235-74-1				8,62E+06
23,046	ions 77, 120, 148		2,79E+06			
24,16	alcane					7,00E+06
25,597	Dérivé aromatique chloré					2,62E+06
26,036	alcane					3,42E+06
26,299	Ions 51, 115, 141, 187, 207, 277					2,71E+06
26,534	bis-ethylhexylphtalate (ions 57, 149)					9,16E+06
26,8 <mark>19</mark>	ions 141, 239 (dérivé aromatique acide - cf pic à 22,877)					5,45E+06
31,17	Octachloronaphtalène *	2234-13-1		i i		2,46E+08
31,317	ions 57, 185					1,01E+07
31,563	phtalate (ions 69,91, 149)			ĵ.		2,62E+06
32.240	Decachlorobiphenyl *	2051-24-3				1,07E+07
37,068	Octachloroacénaphtylène *	7267-16-5				2,90E+08
40,538	Dérivé aromatique chloré (ions 207,455)					2,56E+06

Annexe 14 : Composition en matière organique (GC/MS) des particules issues du fumigène 4. (Campagne de prélèvement 2). (1) Amount (% d'aire) : abondance (en pourcentage d'aire de pic) du composé présent sur le chromatogramme par rapport aux autres composés détectés durant l'analyse.

Bibliographie :

- Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopolis Y, Rossi G, Zmirou D, Ballester F, Boumghar A, Anderson HR, Wojtyniak B, Paldy A, Braunstein R, Pekkanen J, Schindler C, Schwartz J. Confounding and effect modification in the shortterm effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiol Camb Mass.* 2001;12:521–531.
- 2. Dominici F, McDermott A, Daniels M, Zeger SL, Samet JM. Revised analyses of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study: mortality among residents of 90 cities. *J Toxicol Environ Health A*. 2005;68:1071–1092.
- 3. Fenger, J., Air pollution in the last 50 years From local to global. Atmospheric Environment, 2009. 43(1): p. 13-22.
- 4. La composition de l'atmosphère [Internet]. [cited 2017 Apr 3];Available from: http://eduscol.education.fr/obter/appliped/circula/theme/atmos22.htm
- 5. Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2008;151:362–367.
- 6. Fiore AM, Naik V, Leibensperger EM. Air quality and climate connections. *J Air Waste Manag Assoc 1995*. 2015;65:645–685.
- 7. L'évolution de la qualité de l'air dans les agglomérations françaises, en situation de fond urbain : Observation et statistiques [Internet]. [cited 2017 Jun 14];Available from: http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/227/226/evolutionqualite-lair-agglomerations-francaises-situation.html
- Watts N, Adger WN, Agnolucci P, Blackstock J, Byass P, Cai W, Chaytor S, Colbourn T, Collins M, Cooper A, Cox PM, Depledge J, Drummond P, Ekins P, Galaz V, Grace D, Graham H, Grubb M, Haines A, Hamilton I, Hunter A, Jiang X, Li M, Kelman I, Liang L, Lott M, Lowe R, Luo Y, Mace G, Maslin M, Nilsson M, Oreszczyn T, Pye S, Quinn T, Svensdotter M, Venevsky S, Warner K, Xu B, Yang J, Yin Y, Yu C, Zhang Q, Gong P, Montgomery H, Costello A. Health and climate change: policy responses to protect public health. *Lancet Lond Engl.* 2015;386:1861–1914.
- Woodcock J, Edwards P, Tonne C, Armstrong BG, Ashiru O, Banister D, Beevers S, Chalabi Z, Chowdhury Z, Cohen A, Franco OH, Haines A, Hickman R, Lindsay G, Mittal I, Mohan D, Tiwari G, Woodward A, Roberts I. Public health benefits of strategies to reduce greenhouse-gas emissions: urban land transport. *Lancet Lond Engl.* 2009;374:1930–1943.
- Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak F, Puybonnieux-Texier V, Quénel P, Schneider J, Seethaler R, Vergnaud JC, Sommer H. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet Lond Engl.* 2000;356:795–801.
- 11. Airparif, Bilan des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en Ilede-france pour l'année 2010 et historique 2000/2005 2013: Paris, France.

- 12. OMS | Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre [Internet]. WHO. [cited 2017 Apr 4];Available from: http://www.who.int/publications/list/who_sde_phe_oeh_06_02/fr/
- 13. WHO | Air quality guidelines global update 2005 [Internet]. WHO. [cited 2017 Apr 4];Available from: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/outdoorair_aqg/en/
- 14. Les comptes des transports en 2015 Tome 1 53e rapport de la commission des comptes des transports de la Nation, Juillet 2016
- 15. Pollution atmosphérique urbaine affset Juin 2006.
- 16. Agence internationale de l'énergie (AIE), 2014.
- 17. M. BISSON J. BUREAU F. DEL GRATTA J.P. LEFEVRE A. LEVILAIN. DIOXYDE DE SOUFRE (SO2) Septembre 2011 I N E R I S Fiche de données tox icologiques et environnementales des substances chimiques
- 18. Smith SJ, van Aardenne J, Klimont Z, Andres RJ, Volke A, Delgado Arias S. Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005. *Atmos Chem Phys.* 2011;11:1101–1116.
- 19. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet Lond Engl.* 2002;360:1233–1242.
- 20. Aristizábal BH, Gonzalez CM, Morales L, Abalos M, Abad E. Polychlorinated dibenzo-pdioxin and dibenzofuran in urban air of an Andean city. *Chemosphere*. 2011;85:170–178.
- 21. Shih Y-H, Kasaon SJ, Tseng C-H, Wang H-C, Chen L-L, Chang Y-M. Health risks and economic costs of exposure to PCDD/Fs from open burning: a case study in Nairobi, Kenya. *Air Qual Atmosphere Health*. 2016;9:201–211.
- 22. Jonson JE, Simpson D, Fagerli H, Solberg S. Can we explain the trends in European ozone levels? *Atmos Chem Phys.* 2006;6:51–66.
- 23. Lefohn AS, Shadwick D, Oltmans SJ. Characterizing changes in surface ozone levels in metropolitan and rural areas in the United States for 1980–2008 and 1994–2008. *Atmos Environ*. 2010;44:5199–5210.
- 24. WHO Expert Consultation: Available evidence for the future update of the WHO Global Air Quality Guidelines (AQGs) (2016) [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 4]; Available from: http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2016/who-expert-consultation-available-evidence-for-the-future-update-of-the-who-global-air-quality-guidelines-aqgs-2016
- 25. Wang J, Hu Z, Chen Y, Chen Z, Xu S. Contamination characteristics and possible sources of PM10 and PM2.5 in different functional areas of Shanghai, China. *Atmos Environ*. 2013;68:221–229.
- 26. Pollution par les particules dans l'air ambiant Synthèse des éléments sanitaires en vue d'un appui à l'élaboration de seuils d'information et d'alerte du public pour les particules dans l'air ambiant- afsset 2009.

- 27. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol*. 2016;7:3.
- 28. Seance1b_Aerosols.ppt Seance2_Aerosols.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 4];Available from: http://www.lmd.polytechnique.fr/~sturquet/teaching_data/Seance2_Aerosols.pdf
- 29. Seinfeld JH, Pandis SN. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. Wiley; 2012.
- 30. Holmes NS. A review of particle formation events and growth in the atmosphere in the various environments and discussion of mechanistic implications. *Atmos Environ*. 2007;41:2183–2201.
- 31. Thurston G, Lippmann M. Ambient particulate matter air pollution and cardiopulmonary diseases. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36:422–432.
- 32. Wang L, Zhong B, Liang T, Xing B, Zhu Y. Atmospheric thorium pollution and inhalation exposure in the largest rare earth mining and smelting area in China. *Sci Total Environ*. 2016;572:1–8.
- 33. Kulshrestha A, Satsangi PG, Masih J, Taneja A. Metal concentration of PM(2.5) and PM(10) particles and seasonal variations in urban and rural environment of Agra, India. *Sci Total Environ*. 2009;407:6196–6204.
- 34. Camatini M, Corvaja V, Pezzolato E, Mantecca P, Gualtieri M. PM10-biogenic fraction drives the seasonal variation of proinflammatory response in A549 cells. *Environ Toxicol*. 2012;27:63–73.
- 35. Gualtieri M, Øvrevik J, Holme JA, Perrone MG, Bolzacchini E, Schwarze PE, Camatini M. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2010;24:29–39.
- 36. Senlin L, Zhenkun Y, Xiaohui C, Minghong W, Guoying S, Jiamo F, Paul D. The relationship between physicochemical characterization and the potential toxicity of fine particulates (PM2.5) in Shanghai atmosphere. *Atmos Environ*. 2008;42:7205–7214.
- 37. Longhin E, Pezzolato E, Mantecca P, Holme JA, Franzetti A, Camatini M, Gualtieri M. Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27:551–559.
- 38. Osornio-Vargas AR, Serrano J, Rojas-Bracho L, Miranda J, García-Cuellar C, Reyna MA, Flores G, Zuk M, Quintero M, Vázquez I, Sánchez-Pérez Y, López T, Rosas I. In vitro biological effects of airborne PM_{2.5} and PM₁₀ from a semi-desert city on the Mexico-US border. *Chemosphere*. 2011;83:618–626.
- 39. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1555–1560.
- 40. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287:1132–1141.

- 41. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Ketzel M, Sørensen M, Loft S, Overvad K, Tjønneland A. Lung cancer incidence and long-term exposure to air pollution from traffic. *Environ Health Perspect*. 2011;119:860–865.
- 42. David Kittelson et Win Watts, réimprimé par HEI 2010. Understanding the Health Effects of Ambient Ultrafine Particles
- 43. Gosens I, Cassee FR, Zanella M, Manodori L, Brunelli A, Costa AL, Bokkers BGH, de Jong WH, Brown D, Hristozov D, Stone V. Organ burden and pulmonary toxicity of nanosized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure. *Nanotoxicology*. 2016;10:1084–1095.
- 44. S.SOBANSKA, M.CHOEL, J.BARBILLAT, J.RIMETZ-PLANCHON, M.MOREAU, C.BREMARD Analyse des Eléments Traces Métalliques dans les particules atmosphériques par micro-imageries: Air Pur N° 75 Deuxième semestre 2008.
- 45. Marris H, Deboudt K, Augustin P, Flament P, Blond F, Fiani E, Fourmentin M, Delbarre H. Fast changes in chemical composition and size distribution of fine particles during the near-field transport of industrial plumes. *Sci Total Environ*. 2012;427–428:126–138.
- 46. Martin N, Lombard M, Jensen KR, Kelley P, Pratt T, Traviss N. Effect of biodiesel fuel on "real-world", nonroad heavy duty diesel engine particulate matter emissions, composition and cytotoxicity. *Sci Total Environ*. 2017;586:409–418.
- 47. Labhasetwar N, Saravanan G, Kumar Megarajan S, Manwar N, Khobragade R, Doggali P, Grasset F. Perovskite-type catalytic materials for environmental applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2015;16:036002.
- 48. Austalian Government, Department of the Environmen and Heritage (2004), "State of the Air: Community Summary 1991-2001". National Standards for Criteria Air Pollutants.
- 49. AIRPARIF Surveillance de la Qualité de l'Air en Ile-de-France. Octobre 2008. Synthèse des connaissances sur les particules en suspension dans l'air: Paris, France.
- 50. Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, Schins RPF, Vogel U, Kreyling WG, Jensen KA, Kuhlbusch TAJ, Schwarze PE, Hoet P, Pietroiusti A, De Vizcaya-Ruiz A, Baeza-Squiban A, Tran CL, Cassee FR. Nanomaterials vs Ambient Ultrafine Particles: an Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect*. 2016;
- 51. Pascal LE, Tessier DM. Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicol Lett.* 2004;147:143–151.
- 52. Calcabrini A, Meschini S, Marra M, Falzano L, Colone M, De Berardis B, Paoletti L, Arancia G, Fiorentini C. Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environ Res*. 2004;95:82–91.
- 53. Kambouchner M. [The small airways: normal histology and the main histopathological lesions]. *Rev Mal Respir*. 2013;30:286–301.
- 54. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5:772–777.

- 55. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev.* 2000;173:27–38.
- 56. Sturm R. Spatial visualization of theoretical nanoparticle deposition in the human respiratory tract. *Ann Transl Med.* 2015;3:326.
- 57. Encyclopédie de sécurité et de santé au travail- 3e édition française. Bureau international du Travail. Chapitre 10.
- 58. Chalupa DC, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, Frampton MW. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect*. 2004;112:879–882.
- 59. Carvalho TC, Peters JI, Williams RO. Influence of particle size on regional lung depositionwhat evidence is there? *Int J Pharm*. 2011;406:1–10.
- 60. Janssen NAH, Hoek G, Simic-Lawson M, Fischer P, van Bree L, ten Brink H, Keuken M, Atkinson RW, Anderson HR, Brunekreef B, Cassee FR. Black carbon as an additional indicator of the adverse health effects of airborne particles compared with PM10 and PM2.5. *Environ Health Perspect*. 2011;119:1691–1699.
- 61. Zhang Z, Kleinstreuer C, Kim CS. Effects of curved inlet tubes on air flow and particle deposition in bifurcating lung models. *J Biomech*. 2001;34:659–669.
- 62. Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet Lond Engl.* 2001;357:704–708.
- 63. Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J Public Health*. 2001;91:553.
- 64. Livingston, K., 50 years on the struggle for air quality in London since the great smog of December 1952. 2002: Greater London Authority.
- 65. Davis DL, Bell ML, Fletcher T. A look back at the London smog of 1952 and the half century since. *Environ Health Perspect*. 2002;110:A734-735.
- 66. Schwartz J. Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions? *Epidemiol Camb Mass.* 2001;12:55–61.
- 67. Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 1993;329:1753–1759.
- 68. Andersen ZJ, Wahlin P, Raaschou-Nielsen O, Ketzel M, Scheike T, Loft S. Size distribution and total number concentration of ultrafine and accumulation mode particles and hospital admissions in children and the elderly in Copenhagen, Denmark. *Occup Environ Med.* 2008;65:458–466.
- 69. Pieters N, Koppen G, Van Poppel M, De Prins S, Cox B, Dons E, Nelen V, Panis LI, Plusquin M, Schoeters G, Nawrot TS. Blood Pressure and Same-Day Exposure to Air Pollution at School: Associations with Nano-Sized to Coarse PM in Children. *Environ Health Perspect*. 2015;123:737–742.

- 70. von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, Elosua R, Hörmann A, Kulmala M, Lanki T, Löwel H, Pekkanen J, Picciotto S, Sunyer J, Forastiere F, Health Effects of Particles on Susceptible Subpopulations (HEAPSS) Study Group. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*. 2005;112:3073–3079.
- 71. Bhaskaran K, Armstrong B, Wilkinson P, Haines A. Air pollution as a carcinogen. *BMJ*. 2013;347:f7607.
- 72. Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, Vineis P, Forastiere F, Saldiva P, Yorifuji T, Loomis D. Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2014;122:906–911.
- 73. Tie X, Wu D, Brasseur G. Lung cancer mortality and exposure to atmospheric aerosol particles in Guangzhou, China. *Atmos Environ*. 2009;43:2375–2377.
- 74. Lyu Y, Zhang K, Chai F, Cheng T, Yang Q, Zheng Z, Li X. Atmospheric size-resolved trace elements in a city affected by non-ferrous metal smelting: Indications of respiratory deposition and health risk. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2017;224:559–571.
- 75. Harrison RM, Bousiotis D, Mohorjy AM, Alkhalaf AK, Shamy M, Alghamdi M, Khoder M, Costa M. Health risk associated with airborne particulate matter and its components in Jeddah, Saudi Arabia. *Sci Total Environ*. 2017;590–591:531–539.
- 76. Mauderly JL. Toxicological and epidemiological evidence for health risks from inhaled engine emissions. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 4:165–171.
- 77. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF. Outcomes for COPD pharmacological trials: From lung function to biomarkers. *Rev Port Pneumol*. 2008;14:579–583.
- 78. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:183–192.
- 79. Leclercq B, Alleman LY, Perdrix E, Riffault V, Happillon M, Strecker A, Lo-Guidice J-M, Garçon G, Coddeville P. Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: Toxicological perspectives. *Environ Res.* 2017;156:148–157.
- 80. Zhao Y, Wang S, Lang L, Huang C, Ma W, Lin H. Ambient fine and coarse particulate matter pollution and respiratory morbidity in Dongguan, China. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2017;222:126–131.
- 81. Li N, Wang M, Bramble LA, Schmitz DA, Schauer JJ, Sioutas C, Harkema JR, Nel AE. The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the particulate oxidant potential. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1116–1123.
- McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, Harrington R, Svartengren M, Han I-K, Ohman-Strickland P, Chung KF, Zhang J. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*. 2007;357:2348–2358.

- 83. Patel MM, Chillrud SN, Deepti KC, Ross JM, Kinney PL. Traffic-related air pollutants and exhaled markers of airway inflammation and oxidative stress in New York City adolescents. *Environ Res.* 2013;121:71–78.
- 84. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Tager I, Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109:2655–2671.
- 85. Cui Y, Sun Q, Liu Z. Ambient particulate matter exposure and cardiovascular diseases: a focus on progenitor and stem cells. *J Cell Mol Med*. 2016;20:782–793.
- 86. Hildebrandt K, Rückerl R, Koenig W, Schneider A, Pitz M, Heinrich J, Marder V, Frampton M, Oberdörster G, Wichmann HE, Peters A. Short-term effects of air pollution: a panel study of blood markers in patients with chronic pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:25.
- 87. Gong J, Zhu T, Kipen H, Wang G, Hu M, Guo Q, Ohman-Strickland P, Lu S-E, Wang Y, Zhu P, Rich DQ, Huang W, Zhang J. Comparisons of ultrafine and fine particles in their associations with biomarkers reflecting physiological pathways. *Environ Sci Technol*. 2014;48:5264–5273.
- 88. Sun Y, Song X, Han Y, Ji Y, Gao S, Shang Y, Lu S, Zhu T, Huang W. Size-fractioned ultrafine particles and black carbon associated with autonomic dysfunction in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance in Shanghai, China. *Part Fibre Toxicol*. 2015;12:8.
- 89. Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Gillen DL, Polidori A, Arhami M, Kleinman MT, Vaziri ND, Longhurst J, Sioutas C. Air pollution exposures and circulating biomarkers of effect in a susceptible population: clues to potential causal component mixtures and mechanisms. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1232–1238.
- 90. Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MC, Kodavanti UP, Evansky PA, Costa DL, Watkinson WP. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2001;64:243–252.
- 91. Pope CA, Hansen ML, Long RW, Nielsen KR, Eatough NL, Wilson WE, Eatough DJ. Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect*. 2004;112:339–345.
- 92. Cascio WE, Cozzi E, Hazarika S, Devlin RB, Henriksen RA, Lust RM, Van Scott MR, Wingard CJ. Cardiac and vascular changes in mice after exposure to ultrafine particulate matter. *Inhal Toxicol*. 2007;19 Suppl 1:67–73.
- 93. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999;99:237–242.

- 94. Bartoli CR, Wellenius GA, Diaz EA, Lawrence J, Coull BA, Akiyama I, Lee LM, Okabe K, Verrier RL, Godleski JJ. Mechanisms of inhaled fine particulate air pollution-induced arterial blood pressure changes. *Environ Health Perspect*. 2009;117:361–366.
- 95. Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Baudrimont I, Delannoy E, Leblais V, Begueret H, Galland MAB, Brochard P, Marano F, Marthan R, Muller B. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: comparison of urban particulate matter and manufactured nanoparticles. *Environ Health Perspect*. 2008;116:1294–1299.
- 96. Møller P, Mikkelsen L, Vesterdal LK, Folkmann JK, Forchhammer L, Roursgaard M, Danielsen PH, Loft S. Hazard identification of particulate matter on vasomotor dysfunction and progression of atherosclerosis. *Crit Rev Toxicol*. 2011;41:339–368.
- 97. Langrish JP, Lundbäck M, Mills NL, Johnston NR, Webb DJ, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Contribution of endothelin 1 to the vascular effects of diesel exhaust inhalation in humans. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2009;54:910–915.
- 98. Kilinç E, Van Oerle R, Borissoff JI, Oschatz C, Gerlofs-Nijland ME, Janssen NA, Cassee FR, Sandström T, Renné T, Ten Cate H, Spronk HMH. Factor XII activation is essential to sustain the procoagulant effects of particulate matter. *J Thromb Haemost JTH*. 2011;9:1359–1367.
- 99. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett*. 2004;149:243–253.
- 100. Lucking AJ, Lundbäck M, Barath SL, Mills NL, Sidhu MK, Langrish JP, Boon NA, Pourazar J, Badimon JJ, Gerlofs-Nijland ME, Cassee FR, Boman C, Donaldson K, Sandstrom T, Newby DE, Blomberg A. Particle traps prevent adverse vascular and prothrombotic effects of diesel engine exhaust inhalation in men. *Circulation*. 2011;123:1721–1728.
- Mills NL, Törnqvist H, Robinson SD, Gonzalez M, Darnley K, MacNee W, Boon NA, Donaldson K, Blomberg A, Sandstrom T, Newby DE. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 2005;112:3930– 3936.
- 102. Madjid M, Willerson JT. Inflammatory markers in coronary heart disease. *Br Med Bull*. 2011;100:23–38.
- 103. Zanobetti A, Canner MJ, Stone PH, Schwartz J, Sher D, Eagan-Bengston E, Gates KA, Hartley LH, Suh H, Gold DR. Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation*. 2004;110:2184–2189.
- 104. Rich DQ, Zareba W, Beckett W, Hopke PK, Oakes D, Frampton MW, Bisognano J, Chalupa D, Bausch J, O'Shea K, Wang Y, Utell MJ. Are ambient ultrafine, accumulation mode, and fine particles associated with adverse cardiac responses in patients undergoing cardiac rehabilitation? *Environ Health Perspect*. 2012;120:1162–1169.
- 105. Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:719–726.

- 106. Furuyama A, Kanno S, Kobayashi T, Hirano S. Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes. *Arch Toxicol*. 2009;83:429–437.
- 107. Karimfar MH, Bargahi A, Moshtaghi D, Farzadinia P. Long-Term Exposure of Lead Acetate on Rabbit Renal Tissue. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18:e22157.
- 108. Houston MC. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med.* 2007;13:S128-133.
- 109. Maluf M, Perin PM, Foltran Januário DAN, Nascimento Saldiva PH. In vitro fertilization, embryo development, and cell lineage segregation after pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter. *Fertil Steril*. 2009;92:1725–1735.
- 110. Brockmeyer S, D'Angiulli A. How air pollution alters brain development: the role of neuroinflammation. *Transl Neurosci*. 2016;7:24–30.
- 111. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94:909–950.
- 112. Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? - L'Actualité Chimique [Internet]. 2003 [cited 2017 Apr 6];Available from: http://www.lactualitechimique.org/Especes-reactives-de-l-oxygene-comment-l-oxygenepeut-il-devenir-toxique
- 113. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med.* 2003;60:612–616.
- 114. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973;134:707–716.
- 115. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24:981–990.
- 116. Imrich A, Ning Y, Lawrence J, Coull B, Gitin E, Knutson M, Kobzik L. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;218:256–264.
- 117. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:1689–1699.
- 118. Araujo JA, Nel AE. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:24.
- Prabhulkar S, Li C-Z. Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosens Bioelectron*. 2010;26:1743– 1749.

- 120. Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J*. 2014;37:99–105.
- 121. Shirley R, Ord ENJ, Work LM. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. *Antioxid Basel Switz*. 2014;3:472–501.
- 122. Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:3139–3142.
- 123. Baeza A, Marano F. [Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress]. *Med Sci MS*. 2007;23:497–501.
- 124. Lawal AO. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicol Lett.* 2017;270:88–95.
- 125. Prado GF, Zanetta DMT, Arbex MA, Braga AL, Pereira LAA, de Marchi MRR, de Melo Loureiro AP, Marcourakis T, Sugauara LE, Gattás GJF, Gonçalves FT, Salge JM, Terra-Filho M, de Paula Santos U. Burnt sugarcane harvesting: particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. *Sci Total Environ*. 2012;437:200–208.
- 126. Chuang K-J, Chan C-C, Su T-C, Lee C-T, Tang C-S. The effect of urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation, and autonomic dysfunction in young adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:370–376.
- 127. Lee JS, Choi YC, Shin JH, Lee JH, Lee Y, Park SY, Baek JE, Park JD, Ahn K, Yu IJ. Health surveillance study of workers who manufacture multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology*. 2015;9:802–811.
- 128. Yoon H-S, Lee K-M, Lee K-H, Kim S, Choi K, Kang D. Polycyclic aromatic hydrocarbon (1-OHPG and 2-naphthol) and oxidative stress (malondialdehyde) biomarkers in urine among Korean adults and children. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:458–464.
- 129. Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys.* 2008;477:183–195.
- 130. Pelclova D, Zdimal V, Fenclova Z, Vlckova S, Turci F, Corazzari I, Kacer P, Schwarz J, Zikova N, Makes O, Syslova K, Komarc M, Belacek J, Navratil T, Machajova M, Zakharov S. Markers of oxidative damage of nucleic acids and proteins among workers exposed to TiO2 (nano) particles. *Occup Environ Med.* 2016;73:110–118.
- 131. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002;30:620–650.
- 132. Shvedova AA, Yanamala N, Kisin ER, Khailullin TO, Birch ME, Fatkhutdinova LM. Integrated Analysis of Dysregulated ncRNA and mRNA Expression Profiles in Humans Exposed to Carbon Nanotubes. *PloS One*. 2016;11:e0150628.

- 133. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005;309:481–484.
- 134. Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Mitochondrial repair of 8oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol*. 2002;37:1189–1196.
- 135. Liou S-H, Tsai CSJ, Pelclova D, Schubauer-Berigan MK, Schulte PA. Assessing the first wave of epidemiological studies of nanomaterial workers. *J Nanoparticle Res Interdiscip Forum Nanoscale Sci Technol*. 2015;17:413.
- 136. Liao H-Y, Chung Y-T, Lai C-H, Wang S-L, Chiang H-C, Li L-A, Tsou T-C, Li W-F, Lee H-L, Wu W-T, Lin M-H, Hsu J-H, Ho J-J, Chen C-J, Shih T-S, Lin C-C, Liou S-H. Six-month follow-up study of health markers of nanomaterials among workers handling engineered nanomaterials. *Nanotoxicology*. 2014;8 Suppl 1:100–110.
- 137. Li Y-J, Kawada T, Matsumoto A, Azuma A, Kudoh S, Takizawa H, Sugawara I. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains. *Exp Lung Res.* 2007;33:227–244.
- 138. Michael S, Montag M, Dott W. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2013;183:19–29.
- 139. Shi T, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt C, Schins RPF. Hydroxyl-radicaldependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ Res.* 2006;101:18–24.
- Choi J-H, Kim J-S, Kim Y-C, Kim Y-S, Chung N-H, Cho M-H. Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci*. 2004;5:11–18.
- 141. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem.* 2003;278:50781–50790.
- 142. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2008;26:339–362.
- 143. Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:327–340.
- 144. Künzli N, Mudway IS, Götschi T, Shi T, Kelly FJ, Cook S, Burney P, Forsberg B, Gauderman JW, Hazenkamp ME, Heinrich J, Jarvis D, Norbäck D, Payo-Losa F, Poli A, Sunyer J, Borm PJA. Comparison of oxidative properties, light absorbance, total and elemental mass concentration of ambient PM2.5 collected at 20 European sites. *Environ Health Perspect*. 2006;114:684–690.

- 145. Cho AK, Sioutas C, Miguel AH, Kumagai Y, Schmitz DA, Singh M, Eiguren-Fernandez A, Froines JR. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environ Res.* 2005;99:40–47.
- 146. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008;117:244–279.
- 147. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res.* 2006;7:125.
- 148. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:S1-13.
- 149. Marie C, Cavaillon J-M. Le rétrocontrôle négatif de l'inflammation: rôle des cytokines antiinflammatoires. *Bull Inst Pasteur*. 1997;95:41–54.
- 150. Smith KA, Maizels RM. IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo. *Eur J Immunol*. 2014;44:150–161.
- 151. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:L566-577.
- 152. Celik H, Akpinar S, Karabulut H, Oktar P, Dursun B, Erguden HC, Gunay S, Sipit T. Evaluation of IL-8 nasal lavage levels and the effects of nasal involvement on disease severity in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*. 2015;38:616–622.
- 153. Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet Lond Engl.* 1995;345:176–178.
- 154. Ghelfi E, Wellenius GA, Lawrence J, Millet E, Gonzalez-Flecha B. Cardiac oxidative stress and dysfunction by fine concentrated ambient particles (CAPs) are mediated by angiotensin-II. *Inhal Toxicol*. 2010;22:963–972.
- 155. Pope CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson AC, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Dockery DW. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J*. 1999;138:890–899.
- 156. Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1725:305–313.
- 157. Huang N-H, Wang Q, Xu D-Q. Immunological effect of PM2.5 on cytokine production in female Wistar rats. *Biomed Environ Sci BES*. 2008;21:63–68.
- 158. Huang Y-CT, Li Z, Carter JD, Soukup JM, Schwartz DA, Yang IV. Fine ambient particles induce oxidative stress and metal binding genes in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41:544–552.

- 159. Saber AT, Jacobsen NR, Bornholdt J, Kjaer SL, Dybdahl M, Risom L, Loft S, Vogel U, Wallin H. Cytokine expression in mice exposed to diesel exhaust particles by inhalation. Role of tumor necrosis factor. *Part Fibre Toxicol.* 2006;3:4.
- 160. Happo M, Markkanen A, Markkanen P, Jalava P, Kuuspalo K, Leskinen A, Sippula O, Lehtinen K, Jokiniemi J, Hirvonen M-R. Seasonal variation in the toxicological properties of size-segregated indoor and outdoor air particulate matter. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27:1550–1561.
- 161. Musah S, DeJarnett N, Hoyle GW. Tumor necrosis factor-α mediates interactions between macrophages and epithelial cells underlying proinflammatory gene expression induced by particulate matter. *Toxicology*. 2012;299:125–132.
- 162. Shang Y, Zhu T, Lenz A-G, Frankenberger B, Tian F, Chen C, Stoeger T. Reduced in vitro toxicity of fine particulate matter collected during the 2008 Summer Olympic Games in Beijing: the roles of chemical and biological components. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27:2084–2093.
- 163. MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl*. 2003;40:47s–51s.
- 164. Takizawa H, Abe S, Okazaki H, Kohyama T, Sugawara I, Saito Y, Ohtoshi T, Kawasaki S, Desaki M, Nakahara K, Yamamoto K, Matsushima K, Tanaka M, Sagai M, Kudoh S. Diesel exhaust particles upregulate eotaxin gene expression in human bronchial epithelial cells via nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:L1055-1062.
- 165. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003;111:455–460.
- 166. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K. The proinflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med*. 2007;64:609–615.
- 167. Koike E, Kobayashi T. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere*. 2006;65:946–951.
- 168. Ghio AJ, Devlin RB. Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:704–708.
- 169. Baulig A, Singh S, Marchand A, Schins R, Barouki R, Garlatti M, Marano F, Baeza-Squiban A. Role of Paris PM(2.5) components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. *Toxicology*. 2009;261:126–135.
- 170. Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, Shirali P, Garçon G. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem Res Toxicol*. 2012;25:904–919.

- 171. Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res.* 2004;567:347–399.
- 172. DeMarini DM, Brooks LR, Warren SH, Kobayashi T, Gilmour MI, Singh P. Bioassaydirected fractionation and salmonella mutagenicity of automobile and forklift diesel exhaust particles. *Environ Health Perspect*. 2004;112:814–819.
- 173. Sato MI, Valent GU, Coimbrão CA, Coelho MC, Sanchez Sanchez P, Alonso CD, Martins MT. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutat Res.* 1995;335:317–330.
- 174. Kuo CY, Cheng YW, Chen CY, Lee H. Correlation between the amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons and mutagenicity of airborne particulate samples from Taichung City, Taiwan. *Environ Res.* 1998;78:43–49.
- 175. Fukino H, Mimura S, Inoue K, Yamane Y. Mutagenicity of airborne particles. *Mutat Res.* 1982;102:237–247.
- 176. Lepers C, André V, Dergham M, Billet S, Verdin A, Garçon G, Dewaele D, Cazier F, Sichel F, Shirali P. Xenobiotic metabolism induction and bulky DNA adducts generated by particulate matter pollution in BEAS-2B cell line: geographical and seasonal influence. J Appl Toxicol JAT. 2014;34:703–713.
- 177. Bräuner EV, Forchhammer L, Møller P, Simonsen J, Glasius M, Wåhlin P, Raaschou-Nielsen O, Loft S. Exposure to ultrafine particles from ambient air and oxidative stressinduced DNA damage. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1177–1182.
- Vinzents PS, Møller P, Sørensen M, Knudsen LE, Hertel O, Jensen FP, Schibye B, Loft S. Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1485–1490.
- 179. Møller P, Danielsen PH, Karottki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg H, Jensen DM, Christophersen DV, Hemmingsen JG, Cao Y, Loft S. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014;762:133–166.
- 180. Stinn W, Teredesai A, Anskeit E, Rustemeier K, Schepers G, Schnell P, Haussmann H-J, Carchman RA, Coggins CRE, Reininghaus W. Chronic nose-only inhalation study in rats, comparing room-aged sidestream cigarette smoke and diesel engine exhaust. *Inhal Toxicol*. 2005;17:549–576.
- 181. Valberg PA, Crouch EA. Meta-analysis of rat lung tumors from lifetime inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect*. 1999;107:693–699.
- 182. Schins RPF, Knaapen AM. Genotoxicity of poorly soluble particles. *Inhal Toxicol*. 2007;19 Suppl 1:189–198.
- 183. Bodeau D. Occupationnal health, The soldier and the industrial base. Chapter 9, Military energetic materials: explosives and propellants. Textbook of military medicine. 1993. p305-57.
- 184. Moreno T, Querol X, Alastuey A, Amato F, Pey J, Pandolfi M, Kuenzli N, Bouso L, Rivera M, Gibbons W. Effect of fireworks events on urban background trace metal aerosol concentrations: is the cocktail worth the show? *J Hazard Mater*. 2010;183:945–949.
- 185. Cheng Y, Engling G, He K, Duan F, Du Z, Ma Y, Liang L, Lu Z, Liu J, Zheng M, Weber RJ. The characteristics of Beijing aerosol during two distinct episodes: impacts of biomass burning and fireworks. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2014;185:149–157.
- 186. Sarkar S, Khillare PS, Jyethi DS, Hasan A, Parween M. Chemical speciation of respirable suspended particulate matter during a major firework festival in India. *J Hazard Mater*. 2010;184:321–330.
- 187. Crespo J, Yubero E, Nicolás JF, Lucarelli F, Nava S, Chiari M, Calzolai G. High-time resolution and size-segregated elemental composition in high-intensity pyrotechnic exposures. *J Hazard Mater*. 2012;241–242:82–91.
- 188. Yerramsetti VS, Sharma AR, Gauravarapu Navlur N, Rapolu V, Dhulipala NSKC, Sinha PR. The impact assessment of Diwali fireworks emissions on the air quality of a tropical urban site, Hyderabad, India, during three consecutive years. *Environ Monit Assess*. 2013;185:7309–7325.
- 189. Song Y, Wan X, Bai S, Guo D, Ren C, Zeng Y, Li Y, Li X. The Characteristics of Air Pollutants during Two Distinct Episodes of Fireworks Burning in a Valley City of North China. *PloS One*. 2017;12:e0168297.
- 190. Godri KJ, Green DC, Fuller GW, Dall'Osto M, Beddows DC, Kelly FJ, Harrison RM, Mudway IS. Particulate oxidative burden associated with firework activity. *Environ Sci Technol*. 2010;44:8295–8301.
- 191. Kirchner D, Gaydos J, Battigelli M. Occupation health, The soldier and the industrial base. Chapter 10, Combustion products of propellants and ammunition. Textbook of military medicine. 1993. p359-96.
- 192. Wallace, J., 2008. Chemical Analysis of Firearms, Ammunition, and Gunshot Residue. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 193. Lach K, Steer B, Gorbunov B, Mička V, Muir RB. Evaluation of exposure to airborne heavy metals at gun shooting ranges. *Ann Occup Hyg.* 2015;59:307–323.
- 194. Wingfors H, Svensson K, Hägglund L, Hedenstierna S, Magnusson R. Emission factors for gases and particle-bound substances produced by firing lead-free small-caliber ammunition. *J Occup Environ Hyg.* 2014;11:282–291.
- 195. Toxicity of Military Smokes and Obscurants: Volume 1 [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 1997 [cited 2016 Jun 22]. Available from: http://www.nap.edu/catalog/5582
- 196. National Research Council (US) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants. Toxicity of Military Smokes and Obscurants: Volume 2 [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1999 [cited 2016 Jun 22]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224562/

- 197. National Research Council (US) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants. Toxicity of Military Smokes and Obscurants: Volume 3 [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 1999 [cited 2017 Apr 9]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224732/
- 198. Hemmilä M, Hihkiö M, Kasanen J-P, Turunen M, Hautamäki M, Pasanen A-L, Linnainmaa K. In vivo and in vitro evaluation of the acute toxicity, the genotoxicity, and the irritation potency of two hexachloroethane-based pyrotechnic smokes. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70:1167–1181.
- 199. Brown RF, Marrs TC, Rice P, Masek LC. The histopathology of rat lung following exposure to zinc oxide/hexachloroethane smoke or installation with zinc chloride followed by treatment with 70% oxygen. *Environ Health Perspect*. 1990;85:81–87.
- 200. Hemmilä M, Hihkiö M, Kasanen J-P, Turunen M, Järvelä M, Suhonen S, Pasanen A-L, Norppa H. Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based pyrotechnic smokes. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2010;701:137–144.
- 201. Hemmilä M, Hihkiö M, Linnainmaa K. Evaluation of the Acute Toxicity and Genotoxicity of Orange, Red, Violet and Yellow Pyrotechnic Smokes In Vitro. *Propellants Explos Pyrotech*. 2007;32:415–422.
- 202.: Hemmilä, M., Hihkiö, M., Harkoma, M., Suonurmi-Virtanen, A., Suhonen, S., Hautamäki, M., Pasanen, A-L., Norppa, H., Kasanen, J-P., and Turunen, M. Evaluation of the technical performance, the toxicological effects and the irritation potency of four pyrotechnic screening smokes. Defence Forces Technical Research Center Publication 20, 2010, 5.
- 203. Hemmilä, M., Hihkiö, M., Pasanen, A-L., Kasanen, J-P., Turunen, M., and Linnainmaa, K. Evaluation of Toxicity and Irritation Potency of a White Buoy Smoke for Marine Use, Proc. 31st Int. Pyrot. Seminar, 2004, 609.
- 204. Karlsson N, Fängmark I, Häggqvist I, Karlsson B, Rittfeldt L, Marchner H. Mutagenicity testing of condensates of smoke from titanium dioxide/hexachloroethane and zinc/hexachloroethane pyrotechnic mixtures. *Mutat Res.* 1991;260:39–46.
- 205. Pettilä V, Takkunen O, Tukiainen P. Zinc chloride smoke inhalation: a rare cause of severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2000;26:215–217.
- 206. Hauschild VD. Chemical exposure guidelines for deployed military personnel. *Drug Chem Toxicol*. 2000;23:139–153.
- 207. Hsu H-H, Tzao C, Chang W-C, Wu C-P, Tung H-J, Chen C-Y, Perng W-C. Zinc chloride (smoke bomb) inhalation lung injury: clinical presentations, high-resolution CT findings, and pulmonary function test results. *Chest*. 2005;127:2064–2071.
- 208. Clode SA, Riley RA, Blowers SD, Marrs TC, Anderson D. Studies on the mutagenicity of a zinc oxide-hexachloroethane smoke. *Hum Exp Toxicol*. 1991;10:49–57.
- 209. Anderson D, Blowers SD, Marrs TC, Rice P. An in vitro and an in vivo unscheduled DNA synthesis assay with a zinc oxide/hexachloroethane (Zn/HCE) smoke. *Hum Exp Toxicol*. 1996;15:38–44.

- 210. Hilaski RJ, Bergmann JD, Carpin JC, Muse WT, Thomson SA. Acute Inhalation Toxicity Effects of Explosively Disseminated - - XM82 Grenade - - Titanium Dioxide. *ResearchGate*. 1992;39.
- 211. Owens EJ, Ward DM. A Review of the Toxicology of Colored Chemical Smokes and Colored Smoke Dyes. *ResearchGate*. 1974;71.
- 212. Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France Brochure - INRS [Internet]. [cited 2016 Jun 22];Available from: http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%20984
- 213. Renoux A, Boulaud D. Les aérosols: physique et métrologie. Tec & Doc Lavoisier; 1998.
- 214. Cachon FBA. Étude de pollution atmosphérique en Afrique Sub-Saharienne : Cas de Cotonou (Bénin) : Caractérisation physicochimique des matières particulaires d'origine urbaine et impact toxicologique sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) cultivées in vitro [Internet]. Dunkerque; 2013 [cited 2017 Apr 10]. Available from: http://www.theses.fr/2013DUNK0348
- 215. Forti E, Bulgheroni A, Cetin Y, Hartung T, Jennings P, Pfaller W, Prieto P. Characterisation of cadmium chloride induced molecular and functional alterations in airway epithelial cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2010;25:159–168.
- 216. De Simone U, Manzo L, Profumo A, Coccini T. In vitro toxicity evaluation of engineered cadmium-coated silica nanoparticles on human pulmonary cells. *J Toxicol.* 2013;2013:931785.
- 217. Akhtar US, McWhinney RD, Rastogi N, Abbatt JPD, Evans GJ, Scott JA. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. *Inhal Toxicol*. 2010;22 Suppl 2:37–47.
- 218. Durga M, Nathiya S, Rajasekar A, Devasena T. Effects of ultrafine petrol exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation, DNA damage and inflammation in human A549 lung cells and murine RAW 264.7 macrophages. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38:518–530.
- 219. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, Chen D, Ding W. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27:1762–1770.
- 220. André V, Billet S, Pottier D, Le Goff J, Pottier I, Garçon G, Shirali P, Sichel F. Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J Appl Toxicol JAT*. 2011;31:131–138.
- 221. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–254.

- 222. Persoz C, Achard S, Leleu C, Momas I, Seta N. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol Lett.* 2010;195:99–105.
- 223. NIOSH Publications and Products NIOSH Alert: Preventing Occupational Exposure to Lead and Noise at Indoor Firing Ranges - (DHHS (NIOSH) Publication Number 2009–136 April 2009). DEPARTEMENT OF HEALTH ABD HUMAN SERVICE. Centers for Diseases Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health.
- 224. Moran, M. P., Ott D.K. (2008). Lead free frangible ammunition exposure at United States AirForce small arms firing ranges, 2005 2007. United State Air Force, AFIOH.
- 225. Shang Y, Fan L, Feng J, Lv S, Wu M, Li B, Zang Y-S. Genotoxic and inflammatory effects of organic extracts from traffic-related particulate matter in human lung epithelial A549 cells: the role of quinones. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2013;27:922–931.
- 226. Koons RD, Grant DM. Compositional variation in bullet lead manufacture. *J Forensic Sci.* 2002;47:950–958.
- 227. Okoturo-Evans O, Dybowska A, Valsami-Jones E, Cupitt J, Gierula M, Boobis AR, Edwards RJ. Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *PloS One*. 2013;8:e72363.
- 228. Ahamed M, Siddiqui MA, Akhtar MJ, Ahmad I, Pant AB, Alhadlaq HA. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396:578–583.
- 229. Fahmy B, Cormier SA. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2009;23:1365–1371.
- 230. Liu Z, Wu Y, Guo Z, Liu Y, Shen Y, Zhou P, Lu X. Effects of internalized gold nanoparticles with respect to cytotoxicity and invasion activity in lung cancer cells. *PloS One*. 2014;9:e99175.
- 231. Bitterle E, Karg E, Schroeppel A, Kreyling WG, Tippe A, Ferron GA, Schmid O, Heyder J, Maier KL, Hofer T. Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the airliquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*. 2006;65:1784–1790.
- 232. Maier KL, Alessandrini F, Beck-Speier I, Hofer TPJ, Diabaté S, Bitterle E, Stöger T, Jakob T, Behrendt H, Horsch M, Beckers J, Ziesenis A, Hültner L, Frankenberger M, Krauss-Etschmann S, Schulz H. Health effects of ambient particulate matter--biological mechanisms and inflammatory responses to in vitro and in vivo particle exposures. *Inhal Toxicol.* 2008;20:319–337.
- 233. Thorne D, Larard S, Baxter A, Meredith C, Gaça M. The comparative in vitro assessment of e-cigarette and cigarette smoke aerosols using the γ H2AX assay and applied dose measurements. *Toxicol Lett*. 2017;265:170–178.
- 234. Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, Amodeo T, Trouiller B, Braun A, Egles C, Lacroix G. Air-liquid interface exposure to aerosols of

poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13:58.

- 235. Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, Seemann G, Dössel O, Mülhopt S, Paur H-R, Fritsch-Decker S, Weiss C, Diabaté S. Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:1590–1602.
- 236. Valway SE, Martyny JW, Miller JR, Cook M, Mangione EJ. Lead absorption in indoor firing range users. *Am J Public Health*. 1989;79:1029–1032.
- 237. Tripathi RK, Sherertz PC, Llewellyn GC, Armstrong CW. Lead exposure in outdoor firearm instructors. *Am J Public Health*. 1991;81:753–755.
- 238. Hsien-Hui Meng, Hsei-Chang Lee. Elemental analysis of primer mixtures and gunshot residues from handgun cartridges commonly encountered in Taiwan. Forensic Science Journal. 2007;6 (1): 39-54.
- 239. Fronabarger JW, Williams MD, Bichay MM. Lead-free primers [Internet]. 2011 [cited 2017 Jan 25]; Available from: http://www.google.ch/patents/US8062443
- 240. EH40/2005 Workplace Exposure Limits (Second edition, 2011). Health and Safety Executive. Containing the List of Workplace Exposure Limits for Use with the Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002.
- 241. Cooper RG, Harrison AP. The exposure to and health effects of antimony. *Indian J Occup Environ Med*. 2009;13:3–10.
- 242. Christoph Bosshard, Claudia Pletscher. Exposition au plomb dans les salles de tir. Version Novembre 2013 Factsheet Division médecine du travail. SUVA.
- 243. INERIS Plomb [Internet]. [cited 2017 Jan 23];Available from: http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/1154
- 244. Voie Ø, Borander A-K, Sikkeland LIB, Grahnstedt S, Johnsen A, Danielsen TE, Longva K, Kongerud J. Health effects after firing small arms comparing leaded and unleaded ammunition. *Inhal Toxicol*. 2014;26:873–879.
- 245. INERIS Cuivre [Internet]. [cited 2017 Jan 23];Available from: http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/683
- 246. Cho W-S, Duffin R, Poland CA, Howie SEM, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K. Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing. *Environ Health Perspect*. 2010;118:1699–1706.
- 247. Wang Z, Li N, Zhao J, White JC, Qu P, Xing B. CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2012;25:1512–1521.

- 248. Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne PS. Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2015;29:502–511.
- 249. Seldén AI, Nygren Y, Westberg HB, Bodin LS. Hexachlorobenzene and octachlorostyrene in plasma of aluminium foundry workers using hexachloroethane for degassing. *Occup Environ Med.* 1997;54:613–618.
- 250. U.S. EPA. IRIS Toxicological Review of Hexachloroethane (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-09/007F, 2011.
- 251. Abdo KM, Grumbein S, Chou BJ, Herbert R. Toxicity and carcinogenicity study in F344 rats following 2 years of whole-body exposure to naphthalene vapors. *Inhal Toxicol*. 2001;13:931–950.
- 252. West JA, Pakehham G, Morin D, Fleschner CA, Buckpitt AR, Plopper CG. Inhaled naphthalene causes dose dependent Clara cell cytotoxicity in mice but not in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;173:114–119.
- 253. Plopper CG, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Malburg SR, Nishio SJ, Chang A, Buckpitt AR. Early events in naphthalene-induced acute Clara cell toxicity. II. Comparison of glutathione depletion and histopathology by airway location. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:272–281.
- 254. Chirino YI, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruíz MC, Segura-García Y, Rosas I, Pedraza-Chaverri J, García-Cuellar CM. PM(10) impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicol Lett.* 2010;193:209–216.
- 255. Miguel F, Augusto AC, Gurgueira SA. Effect of acute vs chronic H2O2-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free Radic Res.* 2009;43:340–347.
- 256. Awodele O, Akindele AJ, Adebowale GO, Adeyemi OO. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Haematological and Oxidative Stress Levels in Commercial Photocopier Operators In Lagos, Nigeria. *Ghana Med J.* 2015;49:37–43.
- 257. Wang J, Zhang H, Zhang T, Zhang R, Liu R, Chen Y. Molecular mechanism on cadmium-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *Int J Biol Macromol.* 2015;77:59–67.
- 258. Espinoza JA, González PA, Kalergis AM. Modulation of Antiviral Immunity by Heme Oxygenase-1. *Am J Pathol*. 2017;187:487–493.
- 259. Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol*. 2013;29:143–157.
- 260. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, Di Stefano E, Slaughter N, Killeen E, Wang X, Huang A, Wang M, Miguel AH, Cho A, Sioutas C, Nel AE. 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 Baltim Md 1950*. 2004;173:3467–3481.

- 261. Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Brunborg G, Schmezer P, Pool-Zobel B, Shanu-Wilson R, Holme JA, Soderlund EJ, Gulati D. The non-genotoxicity to rodents of the potent rodent bladder carcinogens o-anisidine and p-cresidine. *Mutat Res.* 1991;250:115–133.
- 262. Kapuci M, Ulker Z, Gurkan S, Alpsoy L. Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. *Toxicol Ind Health*. 2014;30:82–89.
- 263. Mehta M, Chen L-C, Gordon T, Rom W, Tang M-S. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat Res.* 2008;657:116–121.
- 264. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2000;13:135–160.
- 265. Ovrevik J, Arlt VM, Oya E, Nagy E, Mollerup S, Phillips DH, Låg M, Holme JA. Differential effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;242:270–280.
- 266. Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka MB, Kanitwithayanun J, Promvijit J, Autrup H, Ruchirawat M. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;217:23–33.
- 267. Bourgeois B, Owens JW. The influence of Hurricanes Katrina and Rita on the inflammatory cytokine response and protein expression in A549 cells exposed to PM2.5 collected in the Baton Rouge-Port Allen industrial corridor of Southeastern Louisiana in 2005. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24:220–242.
- 268. Joseph A, Li Y, Koo H, Davis JM, Pollack S, Kazzaz JA. Superoxide dismutase attenuates hyperoxia-induced interleukin-8 induction via AP-1. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:1143–1149.
- 269. Torinuki W, Kumai N, Miura T. Histopathological studies on sun-exposed hexachlorobenzene-induced porphyric rat skin. *Tohoku J Exp Med.* 1981;134:425–430.
- 270. Marrs TC, Colgrave HF, Edginton JA, Brown RF, Cross NL. The repeated dose toxicity of a zinc oxide/hexachloroethane smoke. *Arch Toxicol*. 1988;62:123–132.
- 271. Gopalaswamy UV, Aiyar AS. Biotransformation and toxicity of lindane and its metabolite hexachlorobenzene in mammals. *IARC Sci Publ.* 1986;267–276.
- 272. Brusick DJ. Genotoxicity of hexachlorobenzene and other chlorinated benzenes. *IARC Sci Publ.* 1986;393–397.
- 273. Mackison, F. W., R. S. Stricoff, and L. J. Partridge, Jr. (eds.). NIOSH/OSHA -Occupational Health Guidelines for Chemical Hazards. DHHS(NIOSH) Publication No. 81-123 (3 VOLS). Washington, DC: U.S. Government Printing Office, Jan. 1981.
- 274. Rusyn I, Corton JC. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Mutat Res.* 2012;750:141–158.

275. Svensson CR, Ameer SS, Ludvigsson L, Ali N, Alhamdow A, Messing ME, Pagels J, Gudmundsson A, Bohgard M, Sanfins E, Kåredal M, Broberg K, Rissler J. Validation of an air-liquid interface toxicological set-up using Cu, Pd, and Ag well-characterized nanostructured aggregates and spheres. *J Nanoparticle Res Interdiscip Forum Nanoscale Sci Technol.* 2016;18:86.