



HAL
open science

Toxicité in vitro des particules atmosphériques fines et ultrafines : focus sur les bronchopneumopathies chroniques et la fonction mitochondriale

Jules Sotty

► To cite this version:

Jules Sotty. Toxicité in vitro des particules atmosphériques fines et ultrafines : focus sur les bronchopneumopathies chroniques et la fonction mitochondriale. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS024 . tel-02613773

HAL Id: tel-02613773

<https://theses.hal.science/tel-02613773>

Submitted on 20 May 2020

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.

THESE DE DOCTORAT
Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Présentée par

Jules SOTTY

Toxicité *in vitro* des particules atmosphériques fines et
ultrafines : focus sur les bronchopneumopathies
chroniques et la fonction mitochondriale

Sous la direction du Pr Guillaume GARÇON

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Date de soutenance : 17/10/2019

Membres du jury :

Président : Pr Philippe MARCHETTI

Rapporteur : Pr Armelle BAEZA

Rapporteur : Pr Saadia Kerdine-ROMER

Examineur : Dr Sophie LANONE

Examineur : Dr Jean Marc Lo-GUIDICE

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail. A commencer par mon directeur de thèse, le Pr. Guillaume Garçon qui a encadré ces travaux durant 3 ans. Vous m'avez permis de prendre de l'assurance et de devenir rapidement autonome en me transmettant vos qualités pédagogiques et scientifiques. Merci pour votre aide, pour votre confiance, pour vos encouragements et votre sympathie.

Merci également au Dr. Jean Marc Lo-Guidice, directeur de l'équipe de recherche, pour votre accueil chaleureux dans l'équipe et votre bienveillance, ainsi que pour votre disponibilité et vos conseils avisés.

Un grand merci à Corentin De Sousa, pour ton aide précieuse sur les expérimentations, et pour m'avoir fait progresser au football à tel point que je suis devenu meilleur que toi. Merci à Céline Grare et Djamel Achour pour votre aide sur l'entretien des cultures cellulaires, et sur la cytométrie en flux.

Merci au Dr. Ludivine Canivet qui m'a formé à la recherche en encadrant mes stages de master, avec qui j'ai initié ces travaux et mis au point les cultures de cellules primaires différenciées. Merci également au Dr. Bérénice Leclercq pour avoir pris le temps de me former à la culture cellulaire et au western blot durant sa thèse.

La réalisation de cette étude n'aurait pas été possible sans le travail de tous les collaborateurs. Ainsi, je remercie les Dr. Laurent Alleman et Esperanza Perdrix, pour le prélèvement des particules atmosphériques et leur caractérisation chimique. Merci également au Dr. Anne Platel pour les expérimentations sur la génotoxicité, au Dr. Pierre Dubot pour l'analyse chimique surfacique des particules, et au Dr. Jérôme Kluza pour m'avoir formé à la technologie du Seahorse XF, et pour m'avoir apporté ses conseils et son expertise sur la mitochondrie.

Je tiens aussi à remercier les enseignants de la faculté d'Ingénierie de la Santé de Lille (ILIS) pour m'avoir transmis cette passion pour la recherche scientifique qui transparait dans leur pédagogie, et notamment les Pr. Anabelle Deram et Hervé Hubert, ainsi que les Dr. Evgeniya Babykina, Florent Ocelli et Benjamin Guinhouya. Merci particulièrement au doyen de l'ILIS, le Dr. Franck-Olivier Denayer qui m'a permis de découvrir l'équipe de recherche et qui a attisé mon intérêt pour le monde de la toxicologie.

J'aimerais aussi remercier Romain Dusautoir, mon acolyte doctorant, pour la bonne ambiance qui règne dans notre bureau et pour nos entraides permanentes, ainsi que la récente Dr. Yara Saleh, avec qui j'ai aussi partagé mon expérience de doctorant, et de moniteur d'enseignement.

Merci aux Dr. Christelle Cauffiez, Sebastien Anthérieu, Grégoire Savary, Cynthia Van Der Hauwaert et Nicolas Pottier, ainsi qu'aux futurs Dr. Edmone Dewaeles et Julie Lemaire pour votre accueil dans l'équipe, pour m'avoir apporté votre aide et votre

expérience sur certaines manipulations, et pour la convivialité qui règne dans le laboratoire. J'ai également une pensée pour nos ex-colocataires, Anne Trinh, Raeeeka Khamari, Salim Dekiouk et William Laine.

Merci à la région des Hauts de France ainsi qu'au CPER Climibio pour avoir financé ces travaux de recherche. Merci également à l'Université de Lille, et notamment l'école doctorale biologie-santé pour avoir financé ma thèse.

Merci à mon père à Sophie, à ma mère, à Pierre, à mon petit frère, à tous mes amis et à ma Charlotte pour leur soutien.

Enfin, je souhaiterais remercier les rapporteurs du jury, les Pr. Armelle Baeza et Saadia Kerdine-Römer pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, le Pr. Phillipe Marchetti pour avoir accepté de présider la séance, ainsi que le Dr Sophie LANONE, pour avoir accepté d'être examinatrice du jury, et pour vos précieux conseils donnés lors de mon comité de suivi.

Table des matières

Abréviations	9
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Valorisation scientifique	15

Généralités

1. Définitions.....	19
2. Historique	20

Introduction

1. Caractéristiques des particules atmosphériques	22
1.1. Distribution granulométrique.....	22
1.2. Composition chimique	25
1.3. Sources d'émission	27
1.4. Règlementation et normes de qualités de l'air.....	30
2. L'épithélium respiratoire	32
2.1. Histologie de l'épithélium bronchique	32
2.2. L'immunité innée et l'inflammation aiguë	34
2.3. L'immunité adaptative médiée par les lymphocytes.....	37
2.4. Résolution de l'inflammation	38
2.5. Régénération de l'épithélium.....	39
3. Les bronchopneumopathies chroniques : asthme et BPCO	40
3.1. L'asthme.....	40
3.1.1. Définition et causes.....	40
3.1.2. Physiopathologie.....	42

3.2.	La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)	45
3.2.1.	Définition et causes.....	45
3.2.2.	Physiopathologie	46
3.3.	Asthme et BPCO : deux pathologies inflammatoires chroniques différentes	48
3.4.	Dysfonction mitochondriale et bronchopneumopathies chroniques (BPC) ..	50
3.4.1.	Fonction mitochondriale et stress oxydant.....	51
3.4.2.	Dynamique mitochondriale.....	53
4.	Toxicité respiratoire des PM.....	57
4.1.	Etudes épidémiologiques	57
4.1.1.	Mortalité	58
4.1.2.	Morbidité respiratoire	59
4.2.	Etudes Toxicologiques	62
4.2.1.	Les modèles utilisés en toxicologie des voies respiratoires	62
4.2.2.	Toxicocinétique	66
4.2.3.	Mécanismes d'action toxique	70
	Problématique et objectifs du projet de thèse.....	82

Matériels et Méthodes

1.	Prélèvement et échantillonnage des particules	86
2.	Caractérisation physico-chimique des particules.....	88
2.1.	Distribution granulométrique et potentiel zêta	88
2.2.	Analyse élémentaire par spectrométrie photoélectronique X	89
2.3.	Analyse des métaux et métalloïdes par spectrométrie de masse.....	91
2.4.	Analyse des HAP par chromatographie liquide à haute performance	93
3.	Etude des mécanismes de toxicité sur cellules primaires.....	94
3.1.	Culture primaire et caractérisation de la différenciation cellulaire.....	94
3.1.1.	Culture	94

3.1.2.	Observation en microscopie électronique	96
3.1.3.	Marquages immuno-fluorescents.....	96
3.2.	Exposition des modèles cellulaires aux particules.....	97
3.3.	Cytotoxicité	98
3.3.1.	Dosage de l'ATP intracellulaire	98
3.3.2.	Dosage de la G6PD extracellulaire	99
3.4.	Quantification des cytokines dans le milieu de culture	100
3.5.	Acétylation des histones.....	101
3.5.1.	Dosage des histones acétylés	101
3.5.2.	Activité histone acétyltransférase et histone désacétylase	102
3.6.	Génotoxicité	103
3.6.1.	Test des comètes.....	103
3.6.2.	Test des micronoyaux.....	104
3.7.	Analyse pangénomique	106
3.8.	Analyses statistiques	107
4.	Caractérisation de la fonction mitochondriale.....	108
4.1.	Culture des cellules BEAS-2B	108
4.2.	Exposition des cellules BEAS-2B	108
4.3.	Cytotoxicité et apoptose	109
4.4.	ATP intracellulaire	111
4.5.	Respiration mitochondriale	111
4.6.	Potentiel de membrane mitochondriale	114
4.7.	Stress oxydant mitochondrial	115
4.8.	Réponse anti-oxydante.....	116
4.9.	Dynamique mitochondriale	117
4.10.	Analyses statistiques.....	119

Résultats et Discussions

1. Analyses sur cellules primaires	120
1.1. Caractérisation des modèles <i>in vitro</i>	120
1.2. Cytotoxicité	122
1.2.1. Concentration d'ATP intracellulaire	122
1.2.2. G6PD extracellulaire	123
1.3. Sécrétion de médiateurs inflammatoires	124
1.4. Acétylation des histones	128
1.5. Génotoxicité	130
1.6. Profils d'expression génique.....	132
1.7. Discussion	141
2. Caractérisation de la fonction et de la dynamique mitochondriale. 152	
2.1. Cytotoxicité et apoptose	152
2.2. Potentiel de membrane mitochondrial	155
2.3. Production d'ATP.....	156
2.4. Respiration mitochondriale	157
2.5. Masse mitochondriale.....	159
2.6. Production d'anion superoxyde	160
2.7. Réponse antioxydante	162
2.8. Dynamique mitochondriale	164
2.9. Discussion	167

Conclusion et Perspectives

Bibliographie	176
---------------------	-----

Abréviations

8-OHdG	8-Oxo-2'-DésoxyGuanosine
ACOS	Asthma-COPD Overlap Syndrome
ADNc	ADN complémentaire
ADNm	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine Diphosphate
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AIS	Aerosol Inorganique Secondaire
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AP-1	Activator Protein-1
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BEAS-2B	Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B
BPC	Broncho Pneumopathie Chronique (comprend l'asthme et la BPCO)
BPCO	Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmo
CNRS	Centre National pour la Recherche Scientifique
COX-2	CycloOxygénase 2
CVF	Capacité Vitale Forcée
CYP	Cytochrome P450
DAE	Diamètre Aérodynamique Equivalent
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern Molecules
DHBE	Diseased Human Bronchial Epithelial cells
DL10	Dose Létale pour 10% des cellules
DRP-1	Dynamin Related Protein 1
dUTP	DeoxyUridines Triphosphates
EFR	Explorations Respiratoires Fonctionnelles
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
EROm	Espèce Réactive de l'Oxygène Mitochondriale
FADH2	DiHydro Flavine adénine Dinucléotide
FC	Fold Change
FIS-1	Mitochondrial fission 1 protein
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GCL	Glutamate Cysteine Ligase
GED	Gène Exprimé Différentiellement
GHO	Global Health Organization
GINA	Global Initiative for Asthma

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HAT	Histone AcétylTransférase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDAC	Histone DésACétylase
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HO-1	Hème oxygénase 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAL	Interface Air Liquide
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IFN γ	Interféron gamma
IgA	Immunoglobuline A
IgE	Immunoglobuline E
IL	Interleukine
ILC2	Innate Lymphoid Cells de type 2
IMT-Lille Douai	Institut Mines Télécom Lille Douai
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Line-1	Long-Interspersed Nuclear Element
LPS	LipoPolySaccharides
LT	Lymphocytes T
LTc	Lymphocyte T Cytotoxique
LTh	Lymphocytes T Helpers
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MFN	MitoFusine
MMS	Méthyl Methanesulphonate
MUC5AC	Mucine 5AC
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAEPP	National Asthma Education and Prevention Program
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B
NHBE	Normal Human Bronchial Epithelial cells
NLR	NOD-Like Receptor
NLRP3	NOD-like receptor family, Pyrin domain containing 3
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOX	Oxydes d'azote
NP	Nanoparticules
NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2-ARE	Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2 – Antiox Resp Element
O $_2^{\cdot-}$	Anion Superoxyde
OCR	Oxygen Consumption Rate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPA-1	OPA-1 Mitochondrial Dynamin Like GTPase
OXPPOS	Phosphorylation Oxydative

PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PanCK	PanCytoKeratine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PF	Particules Fines
PGC1- α	Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator 1- α
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIgR	Polymeric Immunoglobulin Receptor
PM	Particulate Matter
PRR	Pattern Recognition Receptor
PUF	Particules Ultrafines
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted
SAGE	Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement
SERPINA1	SErine Protease Inhibitors famille A membre 1
SOX	Oxydes de soufre
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor
TIO ₂	Dioxyde de Titane
TLR	TOLL Like Receptor
TOMM20	Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEMS	Volume Expiratoire Maximal Seconde
XPS	Spectrométrie photoélectronique X
ZO-1	Zona Occludens-1
α 1At	Alpha-1-Antitrypsine
$\Delta\Psi_m$	Potentiel de Membrane Mitochondrial

Liste des figures

Figure 1 : Evolution des émissions de polluants (1990-2017)	21
Figure 2 : Echelle de taille et particules atmosphériques (PM)	23
Figure 3 : Surface spécifique et nombre de particules.....	24
Figure 4 : Représentation schématique de particules carbonées	25
Figure 5 : Composition moyenne des PM en Europe	27
Figure 6 : Concentrations moyennes journalières en PM ₁₀ et en PM _{2.5}	32
Figure 7 : Histologie de l'épithélium bronchique	33
Figure 8 : Rôle de l'épithélium bronchique dans l'immunité innée	36
Figure 9 : Caractéristiques de l'inflammation chronique des voies respiratoires	38
Figure 10 : Réparation normale et pathologique de l'épithélium respiratoire	39
Figure 11 : Asthme allergique et asthme non allergique.....	44
Figure 12 : Cellules immunitaires impliquées dans la pathogenèse de la BPCO	47
Figure 13 : Mécanismes physiopathologiques dans l'asthme et la BPCO.	50
Figure 14 : Respiration mitochondriale et formation des ERO mitochondriaux.....	51
Figure 15 : Cycle dynamique des mitochondries	55
Figure 16 : Mortalité attribuable à une exposition à long terme aux PM _{2.5}	58
Figure 17 : Risque d'hospitalisation pour causes respiratoires et PM ₁₀	60
Figure 18 : Avantages et limites des modèles utilisés en toxicologie	63
Figure 19 : Culture de cellules bronchiques à l'interface air liquide	66
Figure 20 : Mécanismes de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire.....	67
Figure 21 : Rétention pulmonaire de nanoparticules radio-marquées	69
Figure 22 : Paradigme de la réponse hiérarchique au stress oxydant.....	71
Figure 23 : Sources d'ERO causées par l'exposition de l'épithélium aux PM.....	72
Figure 24 : Mécanismes conduisant à la sécrétion de cytokines par l'épithélium	73
Figure 25 : Principaux mécanismes décrits dans la toxicité des PM	81
Figure 26 : Objectifs du projet de thèse	83
Figure 27 : Situation géographique du site de prélèvement.....	86
Figure 28 : Principe d'un impacteur en cascade.....	87
Figure 29 : Distribution granulométrique des PF et des PUF.....	89
Figure 30 : appareil XPS.....	90

Figure 31 : Composition élémentaire en surface des particules	91
Figure 32 : Méthodologie d'exposition des cellules primaires en IAL.....	97
Figure 33 : Protocole d'analyse sur cellules primaires : Etudes exploratoires	98
Figure 34 : Méthodologie d'exposition des cellules BEAS-2B	108
Figure 35 : Protocole d'analyse sur la lignée cellulaire BEAS-2B.....	109
Figure 36 : Réaction de bioluminescence par oxydation de la luciférine	99
Figure 37 : Principe du dosage de la G6PD dans le milieu de culture	100
Figure 38 : Principe de la technologie du multiplex pour le dosage des cytokines .	101
Figure 39 : Aspect d'une puce à ADN (microarray) scannée.....	106
Figure 40 : Principe du test de fragmentation de l'ADN (TUNEL assay).....	111
Figure 41 : Interprétation des mesures d'OCR	114
Figure 42 : Principe du kit TransAM® Nrf2	116
Figure 43 : Images de microscopie des modèles in vitro en IAL.....	120
Figure 44 : Marquages immuno-fluorescents de marqueurs de différenciation	121
Figure 45 : Marquage des Muc5AC observés dans les NHBE et les DHBE	122
Figure 46 : Test de cytotoxicité par dosage de l'ATP intracellulaire.....	123
Figure 47 : Test de cytotoxicité par mesure de l'activité G6PD dans le milieu.....	124
Figure 48 : Sécrétion de cytokine à l'état basal	125
Figure 49 : Sécrétion de cytokines après exposition aiguë ou répétée.....	128
Figure 50 : Activité enzymatique des HAT et HDAC.....	129
Figure 51 : Acétylation des histones H3 en lysine 9 (K9)	130
Figure 52 : Fragmentation de l'ADN évaluée par le test des comètes	131
Figure 53 : Aberrations mitotiques évaluées par le test des micronoyaux.....	132
Figure 54 : Diagramme de Venn.....	138
Figure 55 : Processus biologiques et fonctions moléculaires des GED	139
Figure 56 : Fragmentation de l'ADN et perméabilisation membranaire	153
Figure 57 : Activité des caspases 3,7,8 et 9	154
Figure 58 : Potentiel de membrane mitochondrial	155
Figure 59 : Concentration d'ATP intracellulaire	156
Figure 60 : Consommation d'oxygène (OCR)	158
Figure 61 : Expression des marqueurs de masse mitochondriale	160
Figure 62 : Production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	161
Figure 63 : Comarquage MitoTracker/MitoSOX.....	162
Figure 64 : Expression des protéines de la voie nrf2-ARE.	163

Figure 65 : Activité de liaison de nrf2 à la séquence promotrice.....	163
Figure 66 : Expression des protéines de fusion par western blot	165
Figure 67 : Expression des protéines de fission par western blot.....	166

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des valeurs guides proposées par l'OMS.....	31
Tableau 2 : Classification de la sévérité de l'obstruction respiratoire.....	45
Tableau 3 : Comparatif entre les lignées cellulaires et les cellules primaires	65
<i>Tableau 4 : Concentrations en éléments traces analysées par ICP-MS.....</i>	<i>92</i>
<i>Tableau 5 : Concentrations en HAP Analysées par HPLC</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 6 : Caractéristiques des cellules et des patients.....</i>	<i>95</i>
Tableau 7 : Intervalles de détection des cytokines du kit HCYTOMAG-60K.....	101
<i>Tableau 8 : Interprétation des données d'OCR</i>	<i>113</i>
<i>Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot.....</i>	<i>118</i>
Tableau 10 : Gènes exprimés différemment (NHBE vs BPCO)	133
Tableau 11 : Gènes exprimés différemment (NHBE vs Asthme)	134
Tableau 12 : Expression génique après exposition aux PUF (NHBE)	135
Tableau 13 : Expression génique après exposition PUF (Asthme).....	136
Tableau 14 : Expression génique après exposition aux PUF (BPCO).....	137

Valorisation scientifique

Publications

J Sotty, G Garçon, FO Denayer, LY Alleman, Y Saleh, E Perdrix, V Riffault, P Dubot, JM Lo-Guidice, L Canivet., *Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models*, Environmental Research, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>

A Platel, K Privat , E Vernet, S Talahari, Y Saleh, **J Sotty**, S Antherieu, G Garçon, FO Denayer, JM Lo Guidice, F Nesslany., *Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine (PM_{2.5}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles on lung models*, accepté dans le journal Science of the Total Environment, 2019

Y Saleh, S Antherieu, R Dusautoir, LY Alleman, **J Sotty**, C De Sousa, A Platel, E Perdrix, V Riffault, I Fronval, F Nesslany, L Canivet, G Garçon, JM Lo-Guidice., *Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice*, International Journal of Environmental Research and Public Health 16(7), 2019. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071210>

B Leclercq, J Kluza, S Antherieu, **J Sotty**, LY Alleman, E Perdrix, A Loyens, P Coddeville, JM Lo Guidice, P Marchetti, G Garçon., *Air pollution-derived PM_{2.5} impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells*, Environmental Pollution, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.062>

EN PREPARATION:

J Sotty, J Kluza, C De Sousa, C. Grare, D. Achour, LY Alleman, L. Canivet, E Perdrix, JM Lo-Guidice, G Garçon., *Alteration of mitochondrial dynamic/function as an early lung toxicity mechanism of fine and ultrafine ambient particulate matter*

Communications par affiche (poster)

“Alteration of mitochondrial dynamic/function as an early lung toxicity mechanism of particulate matter”

Congrès de la Société Française de Toxicologie, Grand Palais, Lille, Novembre 2018

“Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models”

Journée de la recherche de la faculté de pharmacie, Lille, Juillet 2017

→ Prix pour la meilleure présentation de poster

Congrès de la Société Française de Toxicologie, Maison de la RATP, Paris, France, Novembre 2017

Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) - Europe 27th Annual Meeting, Square Conference Center, Bruxelles, Mai 2017

Communications orales

Scientifiques

“Effects of repeated exposure to fine particles (PM_{0.18-2.5}) and ultrafine particles (PM_{0.18}) on inflammatory chronic lung disease exacerbation” Journée André Verbert, Faculté de Médecine de Lille, Septembre 2018

“Effets de l'exposition réitérée à des particules atmosphériques fines (PM_{0.18-2.5}) et quasi-ultrafines (PM_{0.18}) sur l'exacerbation de maladies inflammatoires chroniques pulmonaires”, Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air (JIQA), Learning Center Innovation, Lille, Février 2017

Grand publique

Table citoyenne “Pollution de l'air à Lille, en parler et agir”, Université de Lille, Novembre 2018. Invité pour parler des effets sanitaires de la pollution de l'air

Contexte

L'impact sanitaire de la pollution de l'air est aujourd'hui avéré. Selon les estimations de l'OMS, la pollution atmosphérique est la première cause environnementale de mort prématurée dans le monde, causant 4,2 millions de décès en 2016. Une étude publiée en mars 2019 a réévalué ces chiffres et estime le taux de mortalité global à 8,79 millions par an, dont 790000 en Europe [1]. Le risque est insidieux et touche aussi bien les populations de pays à revenus faibles, intermédiaires ou élevés. Les polluants particulaires ou Particulate Matter (PM) en anglais, regroupent toutes les substances solides ou liquides dispersées dans l'atmosphère. Ces polluants sont d'origines diverses. Ils interagissent avec les gaz de l'atmosphère et forment un mélange complexe, dont les caractéristiques physicochimiques sont influencées par l'environnement et la météo. Les particules de taille inférieure à 10 μm , les PM_{10} , peuvent se déposer dans les voies respiratoires à plusieurs niveaux après inhalation et interagir avec l'épithélium bronchique. Des études épidémiologiques ont établi un lien entre la fluctuation des PM_{10} à court terme, et les indicateurs de santé témoignant de l'exacerbation de bronchopneumopathies inflammatoires telles que l'asthme et la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO). A long terme, les lésions répétées de l'épithélium peuvent donner lieu à un remodelage tissulaire progressif, une hyperréactivité bronchique et des modifications épigénétiques caractéristiques des bronchopneumopathies chroniques. De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques ont permis, de manière complémentaire, de mettre en évidence différents aspects de la toxicité cardiovasculaire et respiratoire des PM. Malgré cela, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, notamment dans le cas de l'initiation et de l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques, ne sont pas encore clairement définis. Les préoccupations sanitaires concernent davantage les particules fines, de diamètre inférieur à 2,5 μm ($\text{PM}_{2.5}$), du fait de leur capacité de migration et de rétention dans le poumon profond. Ces particules proviennent pour la plupart de phénomènes de combustion retrouvés dans les moteurs automobiles, les processus industriels et le chauffage résidentiel. De ce fait, elles contiennent des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des métaux connus pour leur propriété oxydative et leur potentiel cancérigène. Avec leur taille inférieure à 100 nm, les particules ultrafines ($\text{PM}_{0.1}$) acquièrent de nouvelles propriétés liées à leur grande

réactivité de surface. Avec l'essor des nanotechnologies dans les années 1990, plusieurs études se sont intéressées à la toxicité des nanoparticules manufacturées (dioxyde de titane, fer, amiante, or, ...). Du fait des technologies nécessaires pour leur suivi et leur échantillonnage, les $PM_{0.1}$ environnementales ont été peu étudiées à ce jour. Pour cette même raison, elles ne figurent pas dans les normes de qualité de l'air, bien qu'elles soient potentiellement responsables d'une large part des effets toxiques attribués aux PM. Alors qu'elles représentent une part négligeable de la masse totale des particules dans l'atmosphère, les $PM_{0.1}$ peuvent représenter plus de 80% de leur nombre. En 2014, dans le cadre du 2^{ème} Plan Régional Environnement Santé, le conseil régional des Hauts de France a financé un projet de recherche pour étudier les impacts toxicologiques des PM microparticulaires ($PM_{2.5}$) et nanoparticulaires ($PM_{0.1}$) dans l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques. Mon travail de thèse a été initié dans le cadre de ce projet de recherche.

Généralités

1. Définitions

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit la pollution de l'air comme « *la contamination de l'environnement [...] par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère.* » La modification de ces caractéristiques a des conséquences à court et long terme sur l'environnement (écosystèmes, agriculture, bâtis), le climat, et la santé humaine. La loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie du 30 décembre 1996 a d'ailleurs une définition prenant en compte ces notions. La pollution de l'air est alors définie par cette loi comme « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances présentant des risques pour la santé, les écosystèmes, d'influer sur le climat, de détériorer les biens matériels, de provoquer des nuisances olfactives. ».

L'air troposphérique, basse couche de l'atmosphère, est un mélange de gaz, dont certains sont en proportion constante. Parmi ceux-ci, 78,08% de diazote (N_2), 20,95% de dioxygène (O_2), 0,93% d'argon (Ar) et 0,0001% d'autres gaz rares (néon (Ne), hélium (He), krypton (Kr)). D'autres composés minoritaires varient en concentration en fonction du temps et de la localité. C'est le cas de la vapeur d'eau (H_2O) (0-4%), du dioxyde de carbone (CO_2) (approximativement 0,04%), et à l'état de trace, du méthane (CH_4), du dioxyde de soufre (SO_2), de l'ozone (O_3) et des oxydes d'azote (monoxyde d'azote (NO), dioxyde d'azote (NO_2), protoxyde d'azote (N_2O)) [2]. A ces gaz s'ajoutent les matières particulaires issues d'activités naturelles telles que le volcanisme, l'envol de poussière, l'érosion, et les réactions photochimiques de l'atmosphère formant de nouvelles particules à partir de gaz précurseurs. Ces composés à teneur variable, bien que faiblement concentrés (moins de 0,1% de la composition de l'atmosphère) influencent les conditions météorologiques à court terme et les conditions climatiques à long terme. Ils contribuent également aux équilibres de la planète tel que l'effet de serre, en absorbant le rayonnement infrarouge émis par la surface terrestre, et en filtrant les rayonnements solaires ultraviolets (UV) dans le cas de l' O_3 [2,3]. Les nombreuses sources de pollution anthropique, fixes ou mobiles, diffuses ou périodiques, alimentent, et modifient ce mélange d'agents gazeux et particulaires. Les

principaux polluants de la phase gazeuse sont le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO_x), les composés organiques volatils (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques volatils (HAP), le monoxyde de carbone (CO), l'ammoniac (NH₃) et l'ozone (O₃). Leurs propriétés toxicologiques découlent directement de leur nature chimique. Les PM, regroupent toutes les substances solides ou liquides dispersées dans l'atmosphère. Ils ne peuvent pas être catégorisés selon leur nature chimique comme c'est le cas pour les gaz, du fait de l'hétérogénéité et de la complexité de leur composition chimique. Les PM sont aujourd'hui catégorisés en fonction de leur Diamètre Aérodynamique Equivalent (DAE) qui conditionne leur capacité de migration dans l'appareil respiratoire. Cette grandeur est équivalente au diamètre d'une sphère de densité égale à 1 ayant la même vitesse de sédimentation que la particule. L'utilisation du DAE permet de s'affranchir des différences de forme et de densité des particules.

2. Historique

La pollution atmosphérique n'est pas un phénomène récent. Il y a 2000 ans, les anciens romains parlaient de « gravioris caeli » (ciel lourd) ou « infamis aer » (air infâme). La pollution de l'air urbain provenait principalement du chauffage domestique au bois, au fumier ou au charbon. L'analyse de carottes glacières issues du Groenland et de l'Antarctique ont montré que l'extraction et le travail du cuivre et du plomb étaient également sources de pollution à grande échelle à cette époque [4]. Les grandes vagues d'industrialisation du 19^{ème} siècle et l'augmentation croissante de la combustion d'énergies fossiles ont significativement augmenté les concentrations en polluants de l'air dans les villes. Plusieurs épisodes de pollutions catastrophiques ont été recensés dans les pays industrialisés au cours du 20^{ème} siècle. Parmi les plus meurtriers figure le « great smog » londonien de décembre 1952, responsable de 12000 morts prématurés [5]. Ces événements ont permis une prise de conscience accrue sur les conséquences sanitaires et environnementales de la pollution de l'air. Au cours de la deuxième partie du XX^{ème} siècle, le développement des techniques d'analyses aboutit à la formation de réseaux de surveillance dans toute la France, coïncidant avec le développement croissant des mesures politiques et de la réglementation visant à diminuer les émissions de polluants. D'une manière générale,

les concentrations en polluants de l'air ont significativement diminué en France depuis les années 1970. Parmi les améliorations notables, de 1990 à 2017, les concentrations en SO_2 ont diminué de 89%, la diminution de concentration est de 75% pour les composés organiques volatils non méthaniques (COVNM), de 57% pour les oxydes d'azote (NO_x) et de 54% pour les particules de DAE inférieur à $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) (Figure 1).

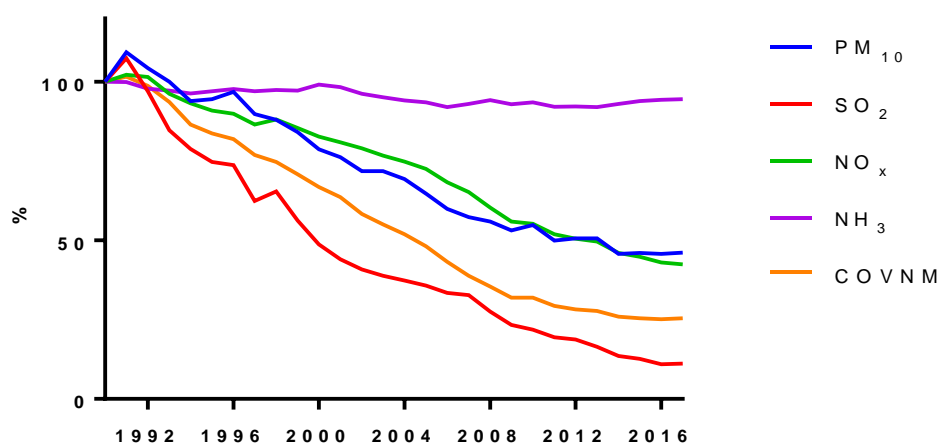


Figure 1 : Evolution des émissions de polluants (1990-2017), d'après le rapport SECTEN du CITEPA (2018)

Malgré la réduction drastique de l'émission de certains polluants d'origine industrielle comme le SO_2 , les concentrations moyennes annuelles en particules atmosphériques stagnent depuis 2010 et dépassent encore régulièrement les limites de qualité fixées par les directives européennes. La pollution aux PM, et particulièrement aux particules fines, de DA inférieur à $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$), représente un enjeu de santé publique majeur en étant responsable de près de 8,8 millions de morts prématurées par an dans le monde, dont 790000 en Europe [1], et 48000 en France [6].

Introduction

1. Caractéristiques des particules atmosphériques

Un certain nombre de caractéristiques peuvent influencer la toxicité des PM telles que leur taille, leur forme, leur charge, leur composition chimique ou leur structure. Il est donc plus complexe de faire le lien entre caractéristiques physicochimiques et propriétés toxicologiques dans le cas des PM, d'autant que ces caractéristiques sont elles-mêmes influencées par l'environnement et les conditions météorologiques [7]. Par conséquent, il est indispensable d'allier la caractérisation physicochimique des PM aux études toxicologiques pour étudier leurs mécanismes d'action toxique. Cela induit une nécessité d'approche pluridisciplinaire alliant la physique, la chimie, et la toxicologie. Historiquement, un seul type de particule était considéré. Les concentrations en PM, ou « total suspended particles (TSP) » étaient mesurées via la masse de particules collectées sur un filtre, divisée par le volume d'air analysé. Dans les années 1980, les premières études de dépôt et de clairance respiratoire des particules suggéraient que les particules les plus fines devaient être responsables pour une majeure partie des conséquences sanitaires recensées. Les particules inhalables ont été définies comme celles ayant un DAE inférieur à $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) [7].

1.1. Distribution granulométrique

L'ensemble des particules en suspension dans l'air comprend plusieurs sous classes de particules regroupées selon leurs tailles. Par convention, les fractions de particules atmosphériques sont notées « PM_x », avec « x » correspondant au DAE maximum de la fraction décrite (Figure 2).

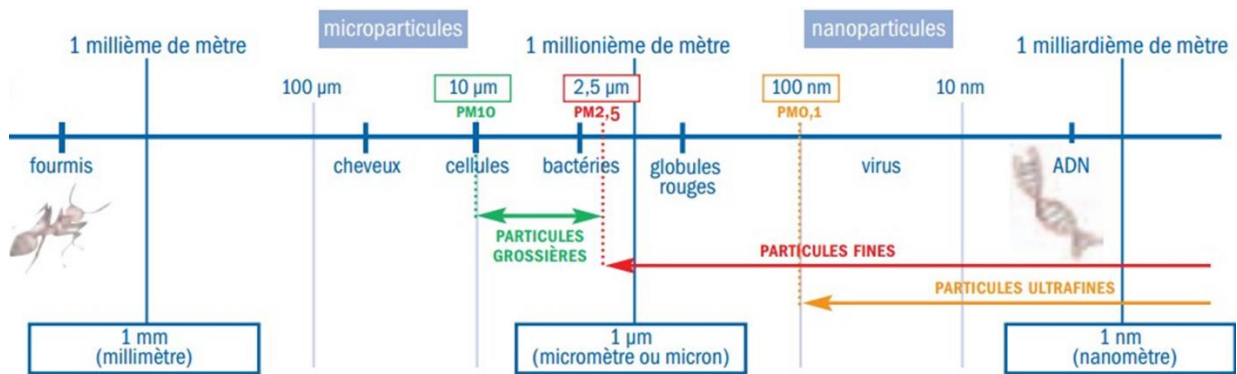


Figure 2 : Echelle de taille et particules atmosphériques (PM), modifié d'après Airparif [8]

Les PM_{10} sont les particules de DAE $<10 \mu\text{m}$. En dessous de ce diamètre, elles sont considérées comme inhalables. Les PM_{10} peuvent migrer dans l'appareil respiratoire et constituent de ce fait un standard pour les mesures de qualité de l'air. Du fait des technologies nécessaires pour détecter et échantillonner les particules plus fines, la fraction des PM_{10} a longtemps été la seule considérée dans les normes de qualité de l'air définies par l'OMS et les directives européennes. Au-delà de ce diamètre, la durée de vie des particules dans l'air est réduite car celles-ci sédimentent plus rapidement. La fraction de particules de DAE compris entre $10 \mu\text{m}$ et $2,5 \mu\text{m}$ ($PM_{10-2,5}$) est qualifiée de fraction grossière par opposition à la fraction fine ($PM_{2,5}$).

Les $PM_{2,5}$, ou Particules Fines (PF), sont les particules de DAE $<2,5 \mu\text{m}$. Ces particules peuvent se déposer dans le parenchyme pulmonaire après inhalation et séjourner dans l'appareil respiratoire durant de longues périodes [9]. En 2000, une méta-analyse regroupant plusieurs études épidémiologiques a montré que la corrélation entre les concentrations en PM_{10} et la mortalité était plus forte dans les zones présentant un ratio $PM_{2,5}/PM_{10}$ plus important [10]. La mesure des concentrations en $PM_{2,5}$ a été intégrée dans les normes de qualité de l'air en 2008 (Article R221-1 du code de l'environnement).

Les $PM_{0,1}$, ou Particules Ultrafines (PUF) sont les particules de DAE $<0,1 \mu\text{m}$ (100 nm). Leur taille nanométrique leur confère de nouvelles propriétés, dont l'augmentation de leur réactivité chimique, principalement liée à l'accroissement de leur surface spécifique. La surface spécifique est l'expression de la surface totale d'un aérosol, ou d'une particule prise individuellement, par rapport à son volume ou sa masse. Ainsi, la

proportion des molécules à la surface d'une particule, de même que la proportion de surface disponible pour interagir avec les tissus biologiques, croît exponentiellement avec la diminution du diamètre [11] (Figure 3). Les molécules de surface étant déterminantes dans le comportement de la matière, la grande surface spécifique des nanomatériaux découple leur réactivité chimique.

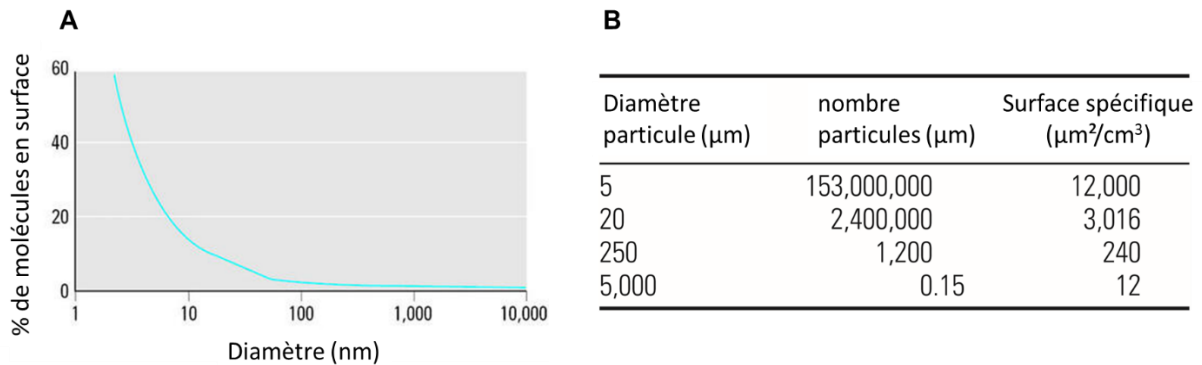


Figure 3 : (A) Pourcentage des molécules en surface en fonction du diamètre d'une particule, (B) Surface spécifique et nombre de particules pour une concentration de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$, modifié d'après Oberdörster et al. [11]

Ces propriétés sont aujourd'hui largement utilisées dans le milieu industriel, où les nanoparticules (NP) manufacturées sont employées en tant que catalyseurs dans les réactions chimiques. Les NP, contrairement aux PUF, ont une nature chimique bien définie (e.g. dioxyde de titane (TiO_2), or (Au), oxyde de zinc (ZnO), argent (Ag)) en lien avec leurs applications. Depuis les années 90, elles ont été intégrées dans plusieurs produits de la vie courante. Par exemple, les NP d'Ag sont utilisées dans les textiles anti-odeurs pour leurs propriétés bactéricides découplées à l'échelle nanométrique, les NP de TiO_2 sont utilisées dans les crèmes solaires pour leur propriétés anti-UV sans laisser de traces blanches. L'étude de la toxicité des NP a ouvert le champ de la nanotoxicologie, et certaines observations peuvent offrir une opportunité pour faciliter la compréhension des mécanismes d'action toxique des PUF [11,12].

De la même façon que l'étude de la fraction fine des PM_{10} ($\text{PM}_{2.5}$) a nécessité une avancée technologique, il a fallu un certain temps pour pouvoir échantillonner des PUF, ce qui explique que les études toxicologiques utilisant des expositions contrôlées aux PUF soient récentes et moins nombreuses. Pour cette même raison, les PUF ne figurent pas dans les normes de qualité de l'air, bien qu'elles soient potentiellement

responsables d'une large part des effets toxiques attribués aux PM. Alors qu'elles représentent une part négligeable de la masse totale des PM dans l'atmosphère, les PUF peuvent représenter plus de 80% du nombre de particules [13,14].

1.2. Composition chimique

La composition chimique des aérosols est un autre déterminant de leurs propriétés toxicocinétiques et toxicodynamiques. Elle est notamment en lien avec leur bioaccessibilité, leur distribution et leur persistance dans l'organisme, mais aussi avec les propriétés toxicologiques intrinsèques des particules telles que leur potentiel oxydant, allergisant ou cancérigène. En milieu urbain, les PM sont principalement composés d'espèces carbonées, provenant d'activités anthropiques telles que le trafic routier, l'industrie et la combustion de biomasse [15]. Le carbone est présent sous forme élémentaire et sous forme organique, associé à l'ensemble des molécules adsorbées sur le carbone élémentaire.

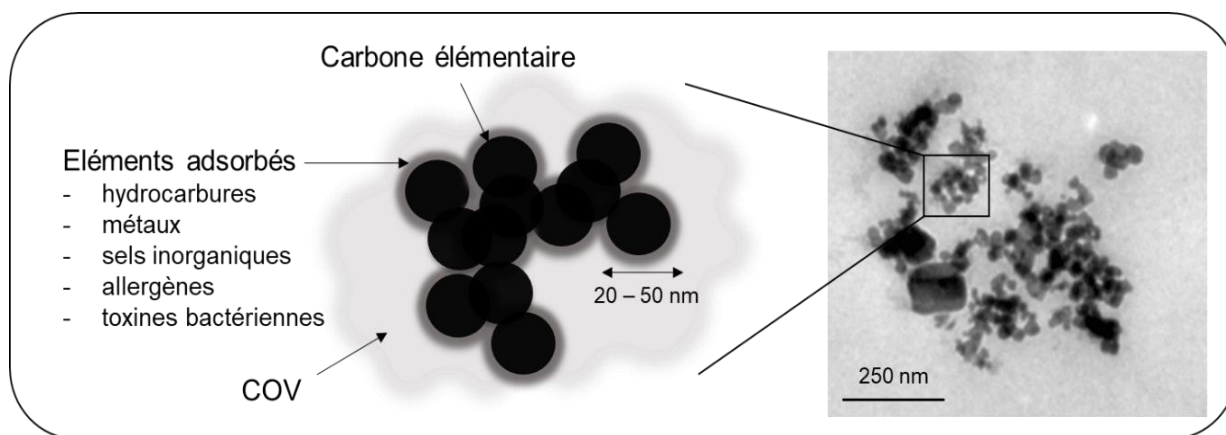


Figure 4 : Représentation schématique de particules carbonées issues de la combustion

Le carbone élémentaire, qui provient des processus de combustion incomplète, est apparenté à du graphite pur et forme le cœur des particules issues de la combustion (Figure 4). La fraction organique provient également des processus de combustion et des composés atmosphériques qui s'adsorbent sur les particules déjà formées. Dans cette fraction organique, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) (e.g. benzo[a]pyrène, naphtalène, fluoranthène) sont des composés

cancérogènes retrouvés systématiquement en milieu urbain [15], [16]. Des espèces ioniques, principalement des sulfates (SO_4^{2-}), des nitrates (NO_3^-) et de l'ammonium (NH_4^+), sont aussi retrouvées en proportion importante dans la composition des PM sous la forme de sels (sulfate d'ammonium, nitrate d'ammonium). Ces composés appelés « aérosols inorganiques secondaires » (AIS) sont issus de la condensation de gaz atmosphériques précurseurs (ammoniac (NH_3), oxydes d'azote (NO_x) et oxydes de soufre (SO_x)) en particules. Une récente étude a montré que les espèces secondaires, nouvellement formées dans l'atmosphère pouvaient contribuer d'avantage à la masse des PM que les composés primaires lors d'épisodes de pollutions importants [17]. Les PM contiennent aussi divers minéraux issus du sol, de l'érosion des roches ou des constructions (e.g. Ca, Si, Al) en moindre quantité, ainsi que des éléments traces métalliques (e.g. Pb, Fe, Cr, Ni, Cd, As, Zn), pouvant provenir de la croûte terrestre, de la combustion, et d'autres sources liées au trafic de véhicules (e.g. freinage). Enfin, une partie de la masse des PM est constituée d'espèces biologiques (e.g. bactéries, virus, champignons, pollens) entières ou fragmentées, adsorbées sur les particules. De ce fait, les PM sont des vecteurs pour le transport d'autres substances, notamment d'endotoxines ou de fragments d'allergènes et peuvent accentuer leur pénétration respiratoire. Par exemple, un grain de pollen (> 10 μm) est habituellement retenu au niveau des voies respiratoires supérieures après inhalation, tandis que les fragments de pollens adsorbés sur les $\text{PM}_{2.5}$ peuvent atteindre les voies respiratoires inférieures [18]. La composition chimique des PM étant liée à la proximité avec les sources de pollution et au climat, la part de chaque élément entrant dans la composition des PM est variable d'un environnement à un autre (Figure 5).

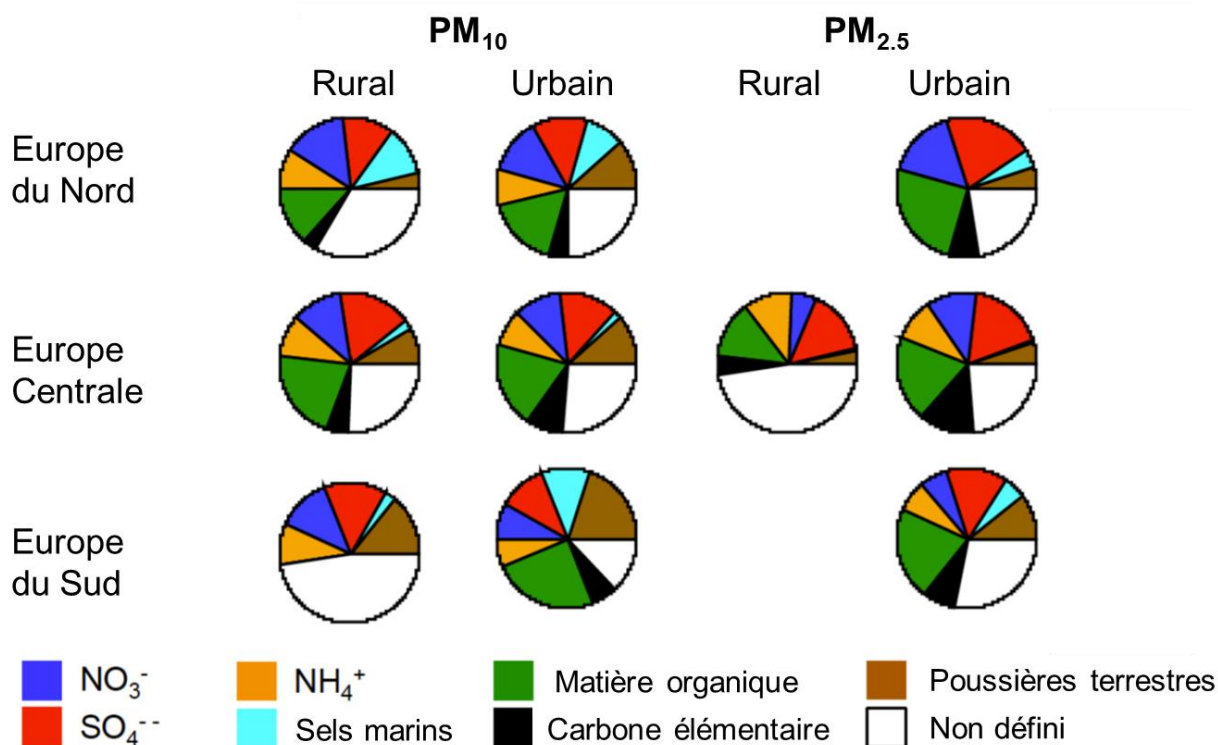


Figure 5 : Composition moyenne des PM en Europe, modifié d'après Fuzzi et al. [19]

1.3. Sources d'émission

Les PM ont une composition chimique variable et hétérogène résultante de diverses sources de pollution. Ces sources peuvent être diffuses ou périodiques, fixes ou mobiles, primaires ou secondaires. Pour cette raison, la contribution relative de chaque source à la composition chimique des PM est un champ d'étude complexe. Les physiciens de l'atmosphère utilisent des modèles statistiques de « source apportement » à l'échelle locale, souvent à l'échelle d'une ville pour reconstruire l'origine de la pollution. Différentes méthodes existent en fonction des moyens et du type de données disponibles (direction du vent, inventaire des émissions, composition chimique de l'air mesurée à différents points, ...) [20]. Bien que les résultats varient en fonction des modèles et des traceurs utilisés, les tendances convergent à l'échelle globale sur l'identification des sources de PM. Les méta-analyses s'accordent généralement sur les types de sources principales [19–24]. Une méta-analyse de différents résultats de « source apportement », publiés en Europe a identifié 6 types de sources principales [24].

Les sels, sources de Na, Cl et Mg. Les sels sont plus concentrés dans les régions costales (embruns marins) ou dans les zones continentales de l'Europe centrale et Europe du nord où ils sont utilisés pour déneiger les routes. Cette source est en moyenne celle qui contribue le moins à la masse des PM ($5\% \pm 3$), et contribue davantage à la masse des PM₁₀ qu'à celle des PM_{2.5} en proportion.

Les poussières terrestres, qui sont remises en suspension par le vent. Elles sont caractérisées par les éléments retrouvés naturellement dans le sol ou dans la croûte terrestre : Al, Si, Ca, Fe. La teneur en poussières terrestres peut être importante dans l'air du bassin méditerranéen durant les épisodes de poussières du Sahara. Cette source contribue à $17\% (\pm 12)$ à la masse totale des PM et est la deuxième plus importante dans la masse des PM₁₀ ($24\% \pm 11$), tandis qu'elle ne contribue qu'à $9\% (\pm 8)$ à la masse des PM_{2.5}.

Les aérosols secondaires (AIS) sont des particules formées dans l'atmosphère via des réactions photochimiques à partir de gaz précurseurs. Les AIS sont principalement composés d'ammonium-sulfates ou de nitrates dérivant du NH₃, des NO_x et des SO_x. L'ammoniac (NH₃), est un gaz émis lors de la fertilisation minérale des sols, et par les déjections animales. Selon le rapport SECTEN 2018 du Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), 94% des émissions de NH₃ en France sont dues à l'agriculture. Les NO_x proviennent des processus de combustion liés aux activités industrielles et particulièrement au trafic routier dans les zones urbaines. Selon l'étude, les AIS contribueraient en moyenne à $33\% (\pm 11)$ de la masse des PM ce qui fait en fait la principale source. Leur contribution relative est plus importante pour les PM_{2.5} (40 ± 11) que pour les PM₁₀ (30 ± 6). Les aérosols organiques secondaires (AOS) proviennent de l'oxydation des COV biogéniques et anthropiques.

Le trafic est une source regroupant l'ensemble des véhicules motorisés, dont les processus de combustion de carburant et de lubrifiants génèrent des hydrocarbures, dont certains HAP et COV, du carbone élémentaire et des gaz précurseurs (SO_x, NO_x). A cela s'ajoute les particules produites dans des proportions non négligeables lors de l'usure des plaquettes de frein, de l'embrayage et des pneus, sources de carbone élémentaire, Fe, Ba, Zn, Cu et Pb. En Europe, le trafic est la deuxième source de PM_{2.5} la plus importante, et la troisième source de PM₁₀.

L'industrie regroupe des émissions de nature chimique hétérogène souvent composées d'hydrocarbures et d'éléments traces métalliques. Ces émissions sont principalement liées à la combustion d'énergie fossile (charbon, huiles végétales) et aux rejets d'autres types d'industries (pétrochimie, métallurgie, pharmaceutique, céramique, activité portuaire, ...). En Europe, la contribution de l'industrie à la masse totale des PM est de l'ordre de 15% (± 6), ce qui fait du secteur industriel la 4^{ème} source la plus importante dans la masse des PM₁₀ et la 3^{ème} plus importante dans la masse des PM_{2.5}.

La combustion de biomasse, telle que le bois, les végétaux ou le charbon, utilisée principalement pour le chauffage résidentiel génère des particules primaires organiques composées de carbone élémentaire et organique, et des gaz précurseurs (SO₂, NO_x, COV). Cette source contribue à 14% (± 6) à la masse totale des PM en moyenne et devient plus importante en hiver.

Une méta-analyse européenne a constaté que certains éléments provenant de sources de combustions tels que le Ni, V et S se retrouvent préférentiellement dans les particules fine (PM_{2.5}), à l'inverse les éléments Si, Fe, Cu sont en part plus importante dans les particules grossières (PM₁₀) [25]. Une autre étude conduite à Beyrouth a démontré que les particules ultrafines locales (PM_{0.3}) étaient plus enrichies en ions solubles inorganiques, en carbone total et en éléments traces que la fraction fine (PM_{2.5-0.3}) collectée sur le même site [26]. La composition chimique de la fraction fine n'est donc pas nécessairement corrélée à celle de la fraction ultrafine, et les différences de toxicités démontrées entre les PM_{2.5} et PM_{0.1} pourraient également être expliquées par leurs compositions chimiques respectives. D'une manière générale, les phénomènes mécaniques (érosion, manutention, remise en suspension) sont une source plus importante de particules grossières (DA > 2 μ m) tandis que les processus de combustion contribuent davantage à l'émission de particules fines. En milieu urbain, les particules ultrafines sont principalement issues des réactions de combustion, provenant notamment du trafic automobile, et formées par nucléation via des sources secondaires [14,27–29]. Une récente étude américaine a également identifié la combustion du gaz naturel comme une source majeure de particules ultrafines dans les villes californiennes [30].

1.4. Règlements et normes de qualité de l'air

Au niveau international, l'OMS a édité des valeurs de concentrations recommandées pour certains des polluants de l'air. Ces lignes directrices se fondent sur les données scientifiques disponibles. Elles visent à « *informer les responsables de l'élaboration des politiques et à fournir des cibles appropriées à toute une série d'actions à mener pour la prévention de la pollution atmosphérique dans les différentes parties du monde. Elles constituent l'évaluation la plus largement reconnue et la plus actuelle des effets de la pollution aérienne sur la santé. Elles préconisent des objectifs de qualité de l'air qui réduisent fortement les risques sanitaires.* ». Les valeurs recommandées par l'OMS sont de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière pour les PM_{10} , et de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière pour les $\text{PM}_{2.5}$ (Tableau 1). Selon les Lignes directrices de l'OMS, abaisser la concentration moyenne annuelle en $\text{PM}_{2.5}$ de 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, un niveau communément enregistré dans nombre de villes en développement, à 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, soit le niveau préconisé par l'OMS, pourrait réduire le taux de mortalité lié à la pollution de l'air d'environ 15%. Ces valeurs limites ne doivent pas être interprétées comme des seuils en dessous desquels il ne serait plus observé d'effet sur la santé. En effet, plusieurs études ont montré que l'excès de mortalité imputable à l'exposition aux PM survenait aussi dans des pays respectant les valeurs limites de l'OMS [31–33].

Dans l'union européenne, la directive 2008/50/CE fixe les valeurs réglementaires de concentration des polluants atmosphériques pour les pays membres. Ces valeurs ont un caractère législatif et les pays de l'UE peuvent être sanctionnés en cas de non-respect des concentrations de polluants de l'air. Cette directive définit aussi les critères relatifs à l'emplacement des points de mesures, les méthodes de références, et les plans d'action à respecter en cas de dépassement des seuils. La directive 2008/50/CE a été transposée à l'échelle nationale (article R 221-1 du code de l'environnement) pour définir les valeurs de concentrations réglementaires en France. Pour les PM_{10} , la valeur limite en moyenne annuelle est de 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, soit deux fois la valeur guide de l'OMS. La moyenne journalière de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ne doit pas être dépassée plus de 35 jours par ans. Pour les $\text{PM}_{2.5}$, la valeur limite en moyenne annuelle est de 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à partir du 1^{er} janvier 2020).

Tableau 1 : Récapitulatif des valeurs guides proposées par l'OMS et des valeurs limites en France et aux Etats Unis.

Valeurs guides		
OMS	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Durée d'exposition
PM₁₀	20	1 an
	50	24 h
PM_{2.5}	10	1 an
	25	24 h
Valeurs limites		
France	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Durée d'exposition
PM₁₀	40	1 an
	50	24h (à ne pas dépasser plus de 35 jours par an)
PM_{2.5}	25 (20 en 2020)	1 an
Valeurs limites		
US-EPA	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Durée d'exposition
PM₁₀	150	à ne pas excéder plus d'une fois par an
PM_{2.5}	15	1 an
	35	24h

A titre de comparaison, aux Etats-Unis, les normes nationales de qualité de l'air sont définies par l'United States Environmental Protection Agency (US-EPA). La valeur limite de concentration en PM_{10} est de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à ne pas dépasser plus d'une fois dans l'année. Les normes pour les $\text{PM}_{2.5}$ sont de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et de $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière (Tableau 1). A ce jour, Il n'existe pas de valeurs de concentration journalière pour les $\text{PM}_{2.5}$ en Europe et aucune recommandation sur les concentrations en particules ultrafines (Tableau 1).

Malgré une diminution importante des concentrations en PM depuis les années 2000, les seuils réglementaires en France sont encore régulièrement dépassés dans

plusieurs régions, et particulièrement dans les Hauts-de-France. D'après les mesures réalisées par Atmo Hauts-de-France en 2018, les seuils recommandés par l'OMS en $PM_{2.5}$ ont été dépassés 57 fois à Lille (51 fois en 2017), soit près d'un jour sur 6 avec une concentration supérieure à $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Figure 6). La France fait partie des états européens faisant l'objet d'une procédure d'infraction pour non-respect de la directive 2008/50/CE, notamment pour les concentrations en NO_2 et en PM_{10} .

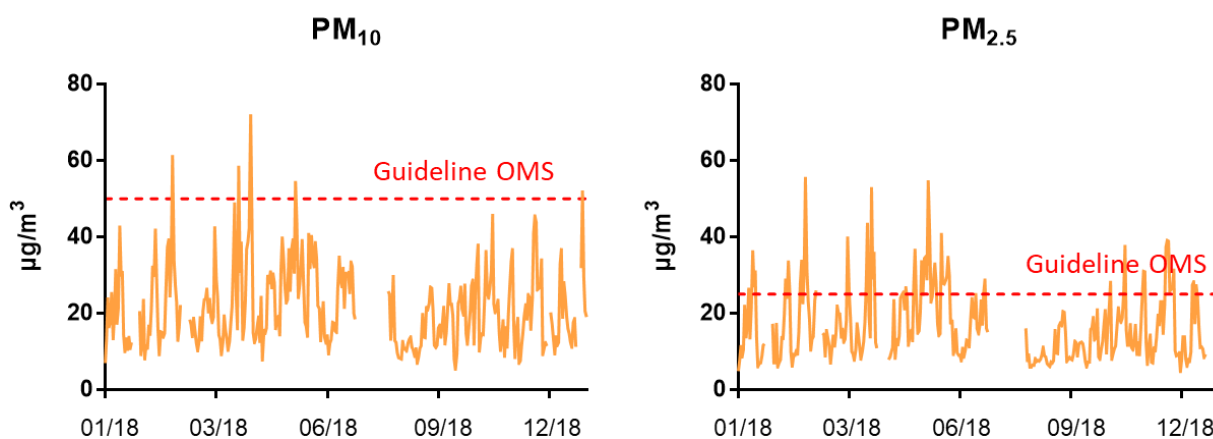


Figure 6 : Concentrations moyennes journalières en PM_{10} et en $PM_{2.5}$ relevées par la station de mesure ATMO Lille Fives durant l'année 2018 (Atmo-hdf.fr)

Si aucune sanction n'a été appliquée à ce jour, la commission européenne a décidé de porter l'affaire devant la Cour de Justice Européenne (CJUE) le 17 mai 2018. Le Royaume-Uni, l'Italie, l'Allemagne, la Roumanie et la Hongrie ont également été renvoyés devant la CJUE. Les Etats concernés risquent en théorie une sanction de 11 millions d'euros, ainsi que des astreintes journalières d'au moins 240 000 euros jusqu'à ce que les normes de qualité de l'air soient respectées.

2. L'épithélium respiratoire

2.1. Histologie de l'épithélium bronchique

L'appareil respiratoire est l'organe responsable des échanges d' O_2 et de CO_2 entre l'organisme et l'environnement extérieur, pour assurer la respiration à l'échelle cellulaire. Il est de ce fait constamment exposé à divers agents pathogènes et constitue une interface fonctionnelle entre les polluants de l'air et le système immunitaire.

L'appareil respiratoire est constitué par un ensemble d'organes et de tissus aux fonctions variées. Les voies respiratoires conditionnent et conduisent l'air jusqu'aux alvéoles, dans lesquelles se déroulent les échanges gazeux. Elles sont revêtues d'une muqueuse spécialisée qui permet de filtrer, d'humidifier et de réguler la température de l'air inspiré. L'épithélium des voies respiratoires qui tapisse la muqueuse, est la première cible en contact avec les PM. C'est un épithélium de type pseudo-stratifié constitué majoritairement de cellules ciliées, dont les cils vibratiles battent continuellement en direction du pharynx, et en moindre quantité, de cellules caliciformes, sécrétrices de mucus et de cellules basales, qui servent de progéniteurs aux cellules ciliées et aux cellules caliciformes (Figure 7). Les cellules basales jouent aussi un rôle important dans la régénération de l'épithélium en migrant et en proliférant pour recouvrir les surfaces lésées [34]. L'association de ces différents types cellulaires permet la mise en place d'un système d'épuration rapidement effectif au niveau nasopharyngé et trachéobronchique : les substances inhalées et déposées dans les bronches sont piégées dans le mucus puis excrétées par l'ascenseur mucociliaire. En conditions normales, les cils battent de 12 à 15 fois par seconde de manière coordonnée, et font avancer la couche de mucus de 1 mm/minute [35].

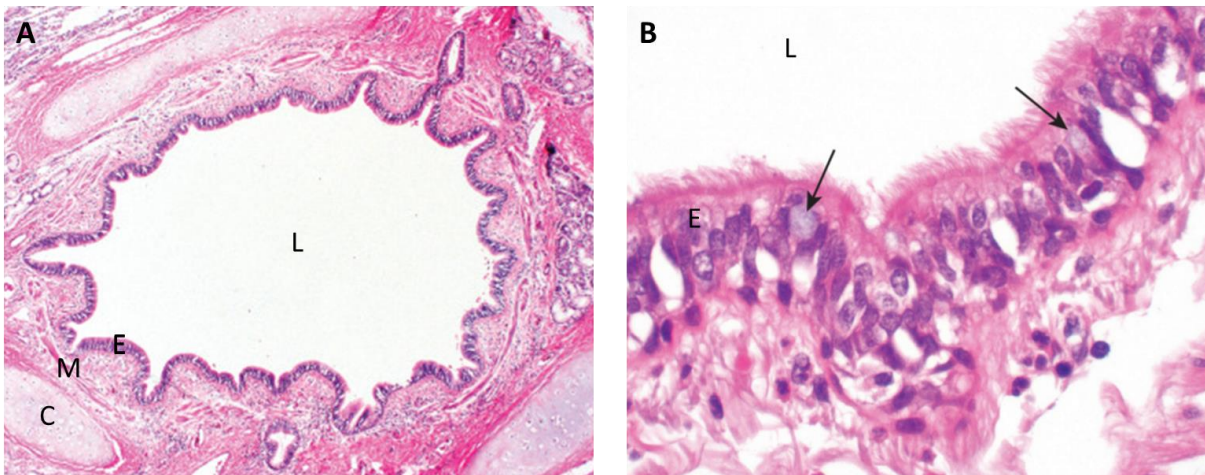


Figure 7 : (A) Section de bronche avec L : lumière bronchique, E : épithélium bronchique, M : muscle lisse, C : cartilage et (B) Epithélium bronchique, avec les cellules caliciformes indiquées par les flèches, modifié d'après Leslie et Wick [36]

Le mucus de l'épithélium respiratoire est sécrété par les glandes sous muqueuses et les cellules caliciformes. Il est principalement composé d'eau, et de

mucines, (e.g. muc5ac, muc5b) qui lui confèrent sa viscosité et ses propriétés rhéologiques. Il contient également des protéines à activité antimicrobienne sécrétées par les cellules immunitaires et épithéliales (e.g. défensines, immunoglobulines A (IgA), lysozyme) [35]. L'activité sécrétoire et la proportion des différents types cellulaires de l'épithélium sont modulés en cas de lésions pulmonaires et d'infections [37], et notamment dans l'asthme et la dans la BPCO. La structure histologique de l'épithélium évolue progressivement tout au long du conduit respiratoire. L'épithélium est plus épais et riche en cellules ciliées dans les voies respiratoires supérieures et s'amincit progressivement vers les bronchioles (< 2 µm de diamètre) et les alvéoles pour permettre une surface d'échange optimale. A ce niveau, l'épithélium est un simple épithélium squameux couvert par un liquide surfactant. Il est beaucoup plus sensible aux agressions. L'épuration alvéolaire est assurée uniquement par les macrophages qui constituent l'ultime moyen d'élimination des particules de l'appareil respiratoire.

2.2. L'immunité innée et l'inflammation aiguë

L'épithélium bronchique constitue la première ligne de défense contre les agressions des voies respiratoires. Ses jonctions serrées (e.g. zonula occludens (ZO)) lui confèrent un rôle de barrière physique, tandis que l'ascenseur mucociliaire évacue les matières piégées dans le mucus vers le pharynx. La présence de corps neuroépithéliaux permet d'activer le système parasympathique après stimulation de l'épithélium, pour déclencher la bronchoconstriction. Ce réflexe permet de diminuer le diamètre des voies respiratoires et réduire le flux d'air vers les régions distales pour prévenir le dépôt des particules inhalées dans les bronchioles et les alvéoles [38].

Les cellules épithéliales jouent aussi un rôle clef dans l'orchestration de la réaction inflammatoire. Les récepteurs de la famille des Pattern Recognition Receptors (PRR) leur permettent de reconnaître des motifs pathogéniques étrangers à l'organisme ou Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) et des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires ou Damage-Associated Molecular-Pattern (DAMP), aussi appelés « alarmines ». Les récepteurs PRR exprimés à la surface des cellules et des endosomes appartiennent à la famille des Toll Like Receptors (TLR), tandis que les NOD Like Receptors (NLR) sont exprimés dans le cytoplasme. L'association des NLR avec la procaspase-1 forme des complexes protéiques nommés inflammasomes.

L'inflammasome le plus étudié à ce jour est le NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3 (NLRP3) dont la stimulation conduit à la sécrétion d'IL-1 β [39]. Les différents types de PRR ont des structures différentes et peuvent être activés par différents types de PAMP (e.g. bactéries gram -, gram +, virus) et de DAMP (e.g. ADN mitochondrial, HSP70). Néanmoins, ils partagent beaucoup de similitudes dans la transduction du signal, notamment pour l'activation du nuclear factor-kappa B (NF- κ B), qui conduit à la transcription de divers gènes pro-inflammatoires [40]. Les cellules épithéliales possèdent également des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, dont le plus connu est l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Plusieurs ligands sont capables de se lier à différents domaines de l'EGFR (e.g. Transforming Growth Factor- α (TGF- α), épiréguline, Epidermal Growth Factor (EGF), amphiréguline). L'activation d'EGFR entraîne sa dimerisation, et l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation en aval telles que Phospholinositide 3-Kinase-AKT (PI3K/AKT), Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT), et les MAP kinases (MAPK) [41,42]. Ces voies de signalisations impliquent les kinases et jouent toutes un rôle important dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire. En réponse à ces stimuli, les cellules épithéliales, les macrophages résidents et les cellules dendritiques (cellules sentinelles) initient et orientent la réponse immunitaire non spécifique via l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la réaction inflammatoire (Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B), Activator Protein-1 (Ap-1)) [37]. L'activation de ces facteurs de transcription conduit à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines et médiateurs lipidiques) (e.g. Interleukine 1 (IL-1), Interleukine 6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES)). Le microenvironnement résultant provoque le recrutement, la prolifération et l'activation des cellules immunitaires dans la sous-muqueuse telles que les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les polynucléaires (Figure 8).

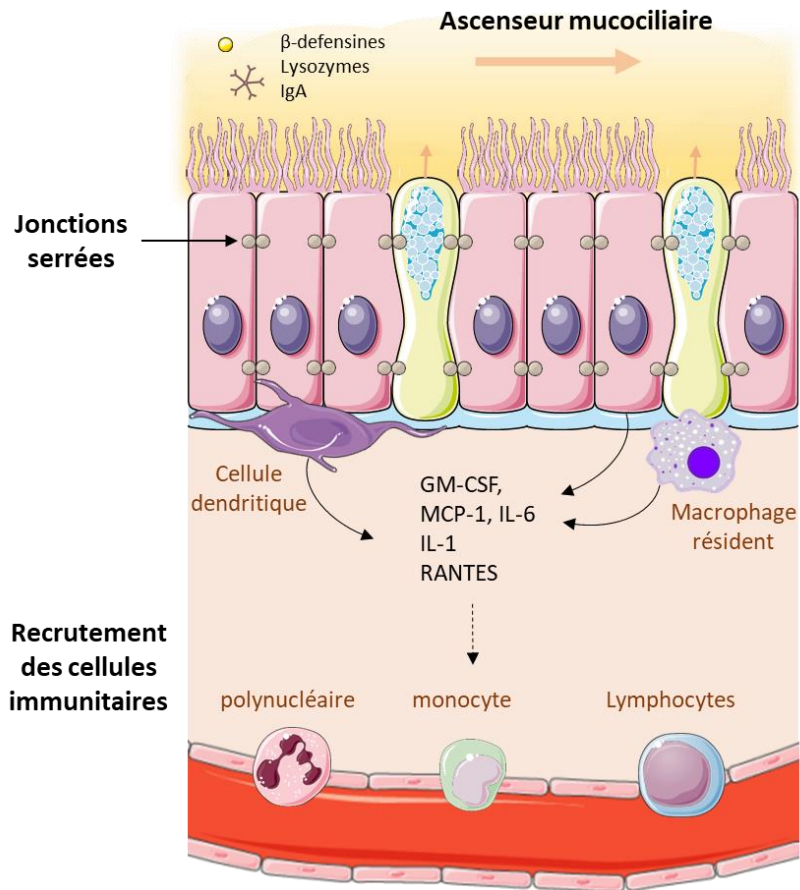


Figure 8 : Rôle de l'épithélium bronchique dans l'immunité innée et la réaction inflammatoire

Lors de la réaction inflammatoire, la sécrétion de mucus et sa concentration en mucines sont augmentées pour protéger la muqueuse respiratoire [35]. Des peptides antimicrobiens, des protéases, des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont sécrétés par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages pour perpétuer la réponse auto-immune. Les cellules épithéliales expriment également le Polymeric Immunoglobulin Receptor (PIgR) à leur surface basale, pour transloquer les IgA vers l'espace luminal. L'épithélium bronchique peut moduler de cette façon le transport actif des IgA dans le mucus et le surfactant [43]. La réaction inflammatoire fait partie des processus de l'immunité innée. Elle est non spécifique et a le même mode d'action, conservé au cours de l'évolution, quel que soit l'agent pathogène rencontré. Si l'inflammation est insuffisante, les mécanismes de l'immunité adaptative se mettent en place.

2.3. L'immunité adaptative médiée par les lymphocytes

Après phagocytose des agents pathogènes, les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages) migrent vers les ganglions lymphatiques et présentent les antigènes spécifiques des pathogènes rencontrés aux lymphocytes T (LT-CD4 et LT-CD8) pour initier la réponse adaptative. Les LT-CD8 activés prolifèrent et se différencient en LT cytotoxiques (LTc) pour détruire spécifiquement les cellules infectées (immunité cellulaire). Les LT-CD4 activés se différencient en LT-auxiliaires, LT-helpers en anglais (LTh), qui sont des producteurs majeurs de cytokines et servent d'intermédiaire dans la réponse immunitaire. En fonction du type de récepteur activé et du profil de cytokines environnantes, les LT-CD4 activés (LTh) peuvent adopter différents profils de sécrétion cytokinique et polariser ainsi la réponse immunitaire [44] ;

Les lymphocytes Th1 sont les lymphocytes auxiliaires de la réponse cellulaire. Ils sécrètent principalement de l'IFN γ , du TNF, de l'IL-1, de l'IL-2 et du GM-CSF. Les cytokines de type Th1 ont tendance à produire une réponse pro-inflammatoire pour tuer les parasites intracellulaires (réponse anti-infectieuse). Elles induisent notamment le recrutement et l'activation des macrophages, et des LT cytotoxiques, ainsi que la sécrétion d'ERO et de protéases. Bien que ce mécanisme fasse aussi partie de la réponse innée (non spécifique), l'immunité cellulaire de type Th1 cible uniquement les cellules infectées [44]. La réponse Th1 peut être à l'origine de lésions tissulaires, notamment dans le cas d'une inflammation chronique. Elle bloque le développement des Th2 via la production d'IFN γ .

Les lymphocytes Th2 produisent principalement de l'IL-4, IL-5, IL9, IL-13 et l'IL-10. La réponse de type Th2 est associée avec une inflammation éosinophilique et la réaction allergique. Elle induit notamment la production d'immunoglobuline E (IgE) par les lymphocytes B différenciés (plasmocytes), l'activation des mastocytes et des éosinophiles. L'IL-10 a une activité anti-inflammatoire en inhibant notamment l'activité des cellules Th1 et l'expression du TNF et des interférons. L'activité des Th1 et des Th2 est donc mutuellement antagoniste. La réponse immunitaire est polarisée en faveur d'un type de réponse en fonction du microenvironnement de cytokines. La dérégulation de la balance Th1/Th2 est impliquée dans de nombreux processus pathologiques tels que les maladies auto-immunes et les allergies [29].

Les lymphocytes Th17, découvert plus récemment produisent principalement de l'IL-17, IL-21 et IL-22. Ils sont associés à une réponse pro-inflammatoire et sont souvent induits simultanément aux Th1 [45]. Ils contribuent à l'activation des neutrophiles et, dans une moindre mesure, des monocytes.

2.4. Résolution de l'inflammation

La réaction inflammatoire doit ensuite être résolue pour éviter des dommages tissulaires supplémentaires et prévenir la progression de l'inflammation aiguë en inflammation chronique. Les mécanismes anti-inflammatoires sont induits par la sécrétion de messagers à action anti-inflammatoire (e.g. IL-10, TGF- β). Ces mécanismes comprennent l'inhibition du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires, ainsi que leur élimination au niveau des foyers d'inflammation par efferocytose. Des antiprotéases et des enzymes anti-oxydantes sont sécrétées pour stopper la dégradation tissulaire et les mécanismes de réparation de l'épithélium sont initiés [46]. Lorsqu'une personne est fréquemment exposée à des pathogènes respiratoires ou que la réponse anti-inflammatoire est insuffisante pour rétablir l'homéostasie, la balance est dérégulée au profit d'un environnement pro-inflammatoire autoentretenu. C'est l'inflammation chronique (Figure 9).

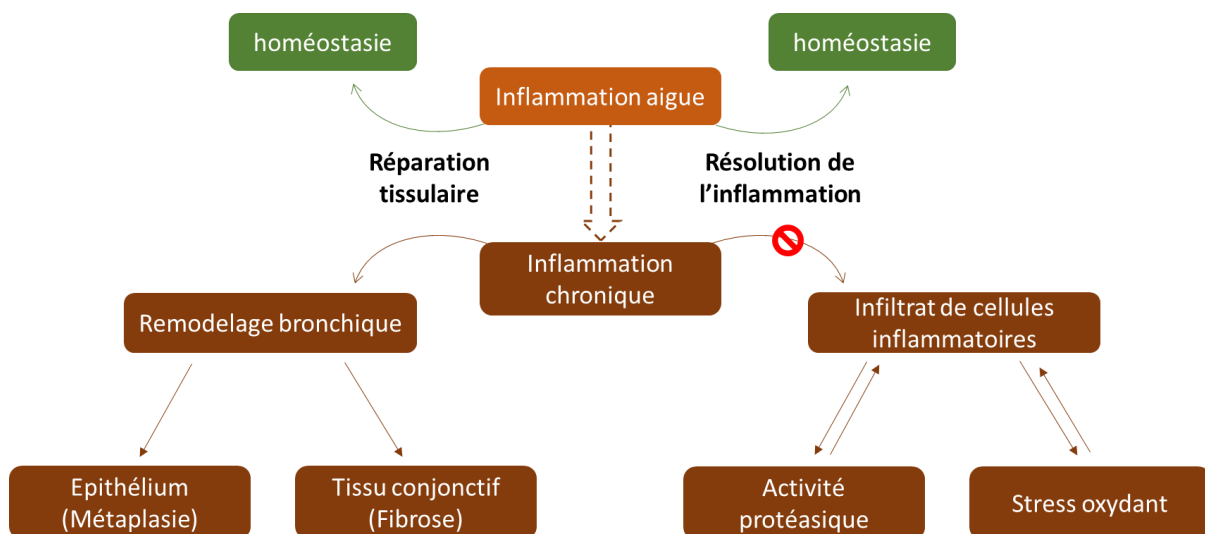


Figure 9 : Caractéristiques de l'inflammation chronique des voies respiratoires

2.5. Régénération de l'épithélium

A la suite de lésions, l'épithélium bronchique peut subir une desquamation partielle et perdre son intégrité. Il peut se régénérer et récupérer ses fonctions en sécrétant des molécules de la matrice extracellulaire, des protéines d'adhésions, et en initiant l'étalement, la migration et la prolifération des cellules basales au niveau de la région lésée. Lorsque la barrière épithéliale est restituée, les cellules basales arrêtent leur prolifération et entrent en phase de différenciation (différenciation sécrétoire et ciliogénèse) [34,47]. Les mécanismes de réparations peuvent être progressivement altérés, à force de lésions et de régénérations répétées. Le remodelage bronchique désigne les modifications structurelles de l'épithélium (e.g. métaplasie squameuse ou malpighienne) (Figure 10) ou du tissu conjonctif (fibrose) qui conduisent à une perte d'intégrité et à des déficiences fonctionnelles. Ces déficiences peuvent inclure une rigidification des bronchioles, une hyperréactivité bronchique, une hypersécrétion de mucus et l'altération de la clairance mucociliaire.

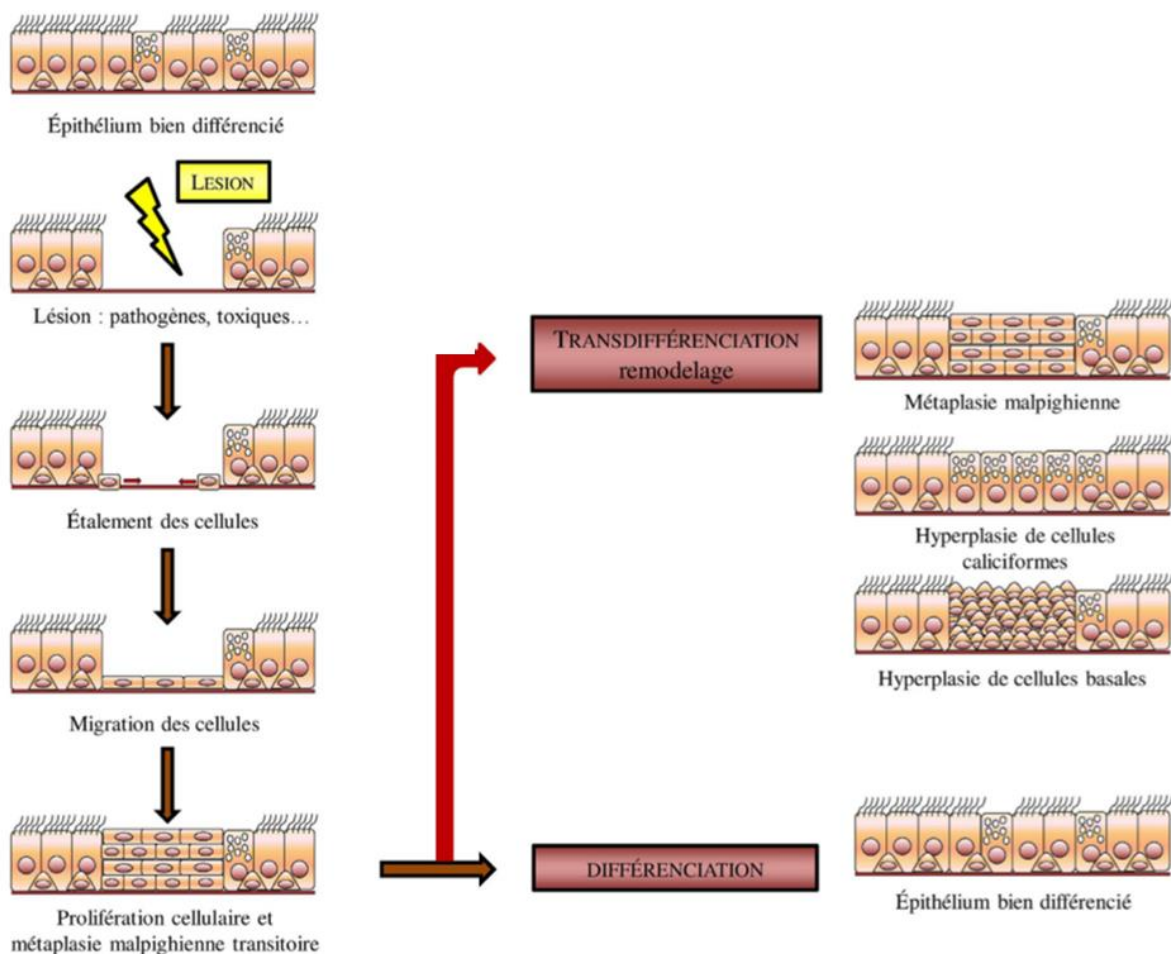


Figure 10 : Réparation normale et pathologique de l'épithélium respiratoire, modifié d'après Adam et al. [34]

L'épithélium bronchique est la première cible en contact avec les polluants de l'air. Il est constitué par l'association de différents types cellulaires, et contribue efficacement à l'élimination des pathogènes des voies respiratoires via l'ascenseur mucociliaire et l'initiation de la réaction inflammatoire. La réaction inflammatoire est un mécanisme permettant d'éliminer les substances exogènes de l'organisme et de réparer les lésions tissulaires en condition physiologique. Toutefois, la dérégulation de l'intensité et/ou de la durée de la réaction inflammatoire peut donner lieu à l'initiation progressive de pathologies inflammatoires chroniques.

3. Les bronchopneumopathies chroniques : asthme et BPCO

De par leur prévalence élevée, le taux de mortalité associé, et les coûts sanitaires engendrés pour la société, les pathologies respiratoires chroniques telles que l'asthme et la BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive) constituent un enjeu de santé publique majeur du 21^{ème} siècle. Ces pathologies sont toutes deux caractérisées par une inflammation chronique des voies respiratoires, influencée par des facteurs environnementaux, et des modifications structurelles de l'épithélium pouvant conduire à certaines déficiences fonctionnelles. Malgré certaines similitudes observées au niveau symptomatique, les causes et les mécanismes inflammatoires à l'origine de ces deux pathologies sont différents.

3.1. L'asthme

3.1.1. Définition et causes

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires, dont la prévalence a largement augmenté ces 50 dernières années [48]. L'asthme affecte 5 à 13% de la population mondiale [49] et est la première maladie chronique chez l'enfant en terme de prévalence, avec une moyenne mondiale estimée à 13,7% chez les 13-14 ans [50]. Les symptômes incluent des épisodes d'obstruction respiratoire, généralement réversibles, liés à la contraction du muscle lisse qui entoure les bronches, et une hypersécrétion de mucus. Ces symptômes peuvent être associés à

un remodelage bronchique dont l'importance croît avec la durée et la sévérité de la maladie. Les crises d'asthme sont causées par l'hyperréactivité bronchique à divers facteurs pouvant être non spécifiques comme l'exposition à des substances irritantes (e.g. fumée de cigarette, pollution de l'air), l'exercice physique ou encore les émotions fortes, ou spécifiques dans le cas d'une sensibilité allergique (e.g. pollens, acariens). La plupart des cas débutent chez l'enfant et sont associés avec une sensibilisation allergique dépendante des IgE. Toutefois, l'asthme peut spontanément disparaître ou apparaître *de novo* à l'âge adulte [51]. Dans les années 1990-2000, cette pathologie était purement considérée comme une pathologie allergique, menant à une réponse inflammatoire à éosinophiles de type Th2, réversible avec un traitement aux corticostéroïdes. Toutefois, l'inefficacité des traitements ciblés sur l'inflammation Th2 chez certains patients et des études cliniques plus récentes suggéraient que tous les cas d'asthmes ne pouvaient pas être expliqués par cette définition [52]. L'asthme regroupe plusieurs phénotypes à différents stades de sévérité, et il n'y a actuellement pas de définition standardisée. Il existe des prédispositions génétiques importantes, notamment dans le cas de l'asthme atopique. D'après l'association Asthme et Allergie reconnue par la haute autorité de santé, une cause allergique est retrouvée dans 70 à 80 % des cas chez l'adulte, et 95 % des cas chez l'enfant. Quatre stades sont distingués en fonction de la sévérité de la pathologie, allant de « intermittent » à « persistant sévère ». L'asthme est aujourd'hui diagnostiqué sur la base des symptômes décrits au médecin (e.g. toux, épisodes de respiration sifflante). Pour confirmer le diagnostic, les patients sont amenés à faire des explorations respiratoires fonctionnelles (EFR), dont certains tests peuvent être réalisés avec bronchodilatateur pour évaluer l'amélioration de la fonction respiratoire qui s'en suit. Parmi ces tests, le test de provocation bronchique permet d'évaluer le degré d'hyperréactivité bronchique de manière non spécifique, après inhalation de substance agonistes des récepteurs du muscle lisse (e.g. méthacholine, histamine). Des tests de sensibilisation cutanée peuvent être utilisés pour identifier les allergènes en cause dans le cas d'une origine allergique.

3.1.2. Physiopathologie

D'après le National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) [53], « L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique des voies respiratoires impliquant divers types cellulaires : en particulier, les mastocytes, les éosinophiles, les neutrophiles (surtout dans le cas d'une apparition tardive, d'exacerbations, d'asthme professionnel ou chez les patients fumeurs), les LT, les macrophages et les cellules épithéliales. » L'inflammation de type Th2 est une des principales caractéristiques de l'asthme. Elle est associée à plus de 80% des cas chez les enfants et à une grande majorité des cas associés à une sensibilisation allergique chez les adultes. Dans le cas d'une sensibilisation allergique, les antigènes pathogéniques activent les lymphocytes B, qui une fois activés initient la sécrétion d'IgE, et activent les lymphocytes T en induisant leur différenciation en LTh2. Les LTh2 sécrètent les interleukines IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et le GM-CSF, qui participent au recrutement et à l'activation des mastocytes et des polynucléaires éosinophiles [51]. Le microenvironnement créé entraîne une réaction aiguë et immédiate caractéristique : la dégranulation des mastocytes, activée par leur liaison aux complexes IgE-antigènes, entraîne la libération de divers médiateurs à action paracrine (e.g. histamine, leucotriènes, cytokines). L'histamine est responsable de la contraction du muscle lisse et d'une perméabilisation vasculaire via l'interaction avec les récepteurs H1 des cellules musculaires lisses et endothéliales (Figure 11). L'interaction de l'histamine, de l'IL-9 [54], et de l'IL-13 [55] avec les récepteurs des cellules sécrétrices entraîne une augmentation de la sécrétion de mucus. Les protéases libérées lors de la réaction inflammatoire peuvent desquamer l'épithélium et activer directement le réflexe de bronchoconstriction neuronal [56]. Une phase d'inflammation tardive peut être observée chez certains patients, notamment dans le cas de l'asthme sévère, ou elle peut persister de manière chronique. Elle survient 3 à 12 heures après la phase aiguë et est liée à l'infiltration des éosinophiles, des mastocytes, des macrophages et parfois des neutrophiles. Les voies respiratoires deviennent hyper réactives [57]. La réaction aiguë est généralement réversible après traitement par bronchodilatateurs, tandis que les corticoïdes peuvent constituer un traitement de fond pour réduire l'inflammation. Toutefois, une étude a montré que, malgré un traitement par corticoïdes, 5 à 10% des patients atteints d'asthme voyaient leur fonction respiratoire diminuer progressivement au cours du temps [58]. Ce phénomène est lié au remodelage de l'épithélium et du

muscle lisse qui entraîne l'épaississement progressif de la paroi bronchique. Les modifications structurelles observées dans l'asthme comprennent un épaississement de la membrane basale, une fibrose sous épithéliale et une perméabilisation de l'épithélium au niveau bronchique, une hypertrophie et une hyperplasie des cellules musculaires lisses ainsi qu'une hyperplasie des cellules caliciformes et glandulaires, associées à une hypersécrétion de mucus [59,60]. Le remodelage bronchique contribue à rendre les bronches hyperréactives et explique en partie l'inefficacité des corticoïdes chez les patients atteints d'asthme sévère. La vision moderne de l'asthme suggère qu'un environnement de cytokines Th2 ne reflèterait pas uniquement une réponse immunitaire adaptative liée à une réaction allergique médiée par les IgE. En effet, plusieurs études montrent l'asthme aurait une composante non atopique importante dont le processus pathologique débute au niveau de l'épithélium bronchique [49]. Il a été montré que la réponse Th2 peut être initiée par la sécrétion d'IL-25, IL-33 et TSLP par les cellules épithéliales suite à l'activation des PRRs. Ces cytokines induisent la sécrétion d'IL-5, IL-9 et IL-13 par les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2) [61,62]. Les ILC2 produisent dix fois plus d'IL-5 et d'IL-13 que les LTh2, et sont associés à la persistance de l'éosinophilie pulmonaire dans l'asthme sévère (Figure 11). Plusieurs études ont montré qu'une expression accrue d'IL-33 et TSLP dans les bronches de personnes asthmatiques était corrélée au degré de sévérité [63–65]. En outre, le ciblage des cytokines IL-25, IL-33 et TSLP ou de leur récepteurs (e.g. TSLPR, ST2) par des anticorps monoclonaux semble être une piste intéressante pour diminuer la production de cytokines TH2 responsables de l'inflammation éosinophilique et l'hypersécrétion de mucus dans l'asthme [62,66].

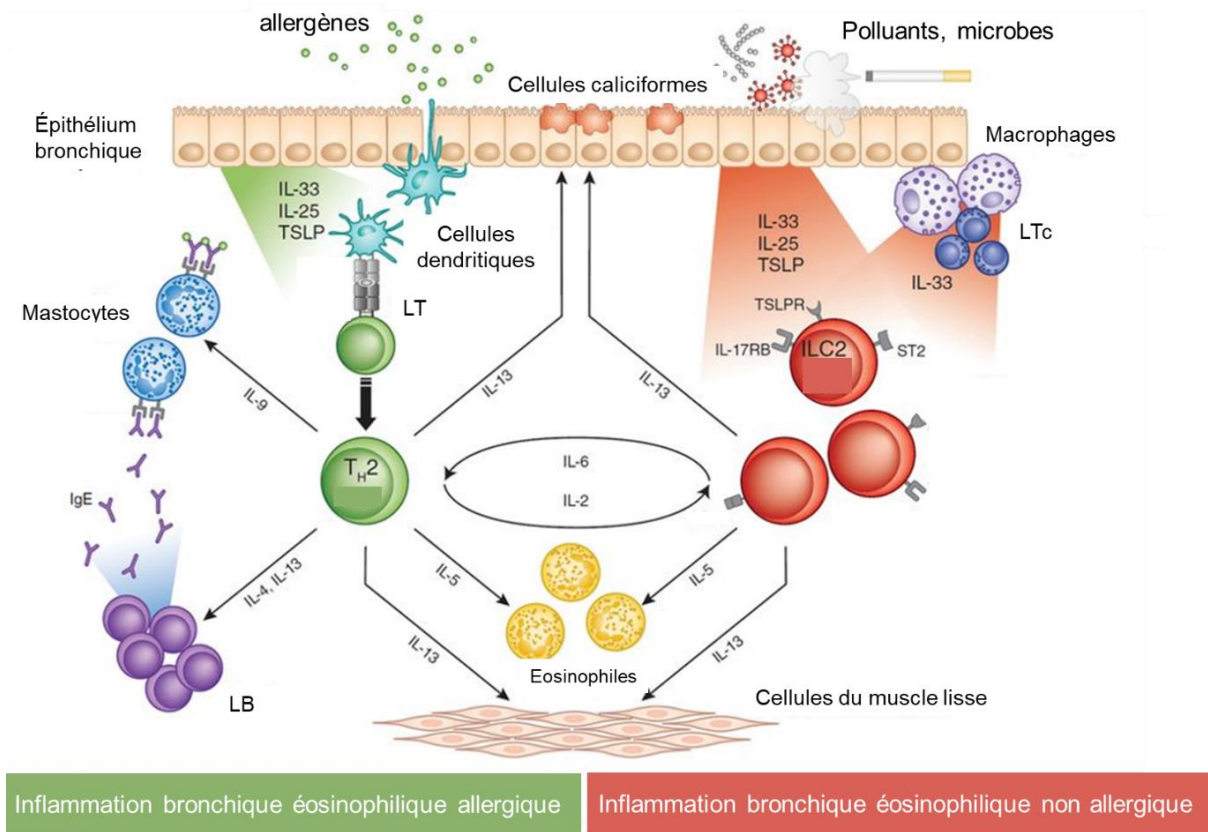


Figure 11 : Asthme allergique et asthme non allergique. Dans l'asthme allergique, les cellules dendritiques présentent les antigènes aux LT-CD4, ce qui induit leur différenciation en L-TH2. Les L-TH2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13, ce qui induit la production d'IgE par les LB, le recrutement d'éosinophiles, et une hypersécrétion de mucus. Dans l'asthme éosinophilique non allergique, les polluants de l'air et les microbes induisent la production par les cellules épithéliales d'IL-33, IL-25 et TSLP, qui activent les ILC2s via leur récepteurs respectifs (IL-17RB, ST2 and TSLPR). Les ILC2 activés produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 en grande quantité, ce qui conduit au recrutement d'éosinophiles, à l'hypersécrétion de mucus et à l'hyperréactivité bronchique indépendamment des antigènes, modifié d'après Brusselle et al. [62]

Il existe également des phénotypes d'asthme sans prédominance d'un environnement Th2. Ce type d'asthme est généralement plus sévère et se développe à l'âge adulte. Il est associé à une inflammation neutrophilique, insensible à l'action des corticoïdes, liée à un environnement Th1/Th17 prédominant [51,67]. L'asthme sévère est aussi associé à un défaut de phagocytose des bactéries (e.g. *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*) par les macrophages [68]. Ce phénomène pourrait contribuer aux exacerbations bactériennes qui caractérisent certaines formes d'asthme.

3.2. La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

3.2.1. Définition et causes

Selon l'OMS, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) deviendra la troisième cause de mortalité dans le monde en 2030. La prévalence en France est estimée à 5-10 % chez les adultes de plus de 45 ans, cependant elle semble sous-estimée [69]. Elle tend à se stabiliser chez les hommes et à augmenter chez les femmes. Le terme BPCO fait référence à des symptômes respiratoires persistants et une diminution du flux d'air, causés par une affection des voies respiratoires inférieures ou des alvéoles. Ces symptômes sont généralement dus à une exposition chronique à des particules ou des gaz néfastes. Cette définition a été formulée par le groupe d'expert du Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) [70]. Elle regroupe la bronchite/bronchiolite chronique qui est caractérisée par une inflammation chronique des bronches ou des bronchioles avec hypersécrétion de mucus, et l'emphysème qui conduit à la perte d'élasticité et la destruction progressive des tissus alvéolaires. La BPCO est aujourd'hui diagnostiquée sur la base d'un test de spirométrie et des symptômes pouvant inclure une dyspnée, une respiration sifflante, une toux chronique et la production d'expectorations. Le test de spirométrie est utilisé pour déterminer (1) la Capacité Vitale Forcée (CVF), qui est le volume d'air total expiré durant une expiration forcée suivant une inspiration maximale, et (2) le Volume Expiratoire Maximal Seconde (VEMS), qui est le volume d'air expiré durant la première seconde d'un test de CVF. En condition normale, le VEMS correspond à 80% de la CVF. La BPCO est diagnostiquée quand le ration VEMS/CVF est inférieur à 0,7 [70]. Le GOLD a défini quatre stades de gravité en fonction de la diminution de la fonction ventilatoire (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification de la sévérité de l'obstruction respiratoire dans la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) d'après le groupe du Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Le test de spirométrie se fait après l'usage d'un bronchodilatateur pour minimiser la variabilité

Stades de sévérité	Spirométrie chez les patients avec VEMS/CVF < 70%
Stade 1 : léger	VEMS \leq 80% de la valeur prédite
Stade 2 : modéré	50% \leq VEMS < 80% de la valeur prédite
Stade 3 : sévère	30 \leq VEMS < 50% de la valeur prédite
Stade 4 : très sévère	VEMS < 30% de la valeur prédite

La pathologie comporte des épisodes d'exacerbation aiguë réversible, plus ou moins fréquents en fonction des patients. La fréquence des exacerbations n'est pas nécessairement corrélée au degré de sévérité de la BPCO, toutefois les exacerbations fréquentes causent une progression plus rapide de la maladie [72]. Le principal facteur de risque est le tabagisme, actif ou passif. Il existe d'autres facteurs comme l'exposition répétée aux polluants de l'air ou à la combustion de biomasse. Les exacerbations aiguës sont dans la plupart des cas causées par une infection virale ou bactérienne [72]. Il existe un syndrome génétique causant une déficience en alpha-1 antitrypsine (α 1AT) prédisposant au développement d'un emphysème. Cette anomalie est en cause dans environ 1% des cas de BPCO. Une mutation au niveau du gène codant pour l' α 1AT (*SERPINA1*) entraîne un défaut de repliement de la protéine, et sa rétention hépatocytaire. L' α 1AT étant le principal inhibiteur de l'élastase du neutrophile, sa déficience induit une activité protéasique incontrôlée et la dégradation des tissus du poumon profond, notamment des fibres d'élastine [73]. Des études montrent que l'hérédité de la BPCO pourrait compter pour 30% dans la variation du risque. En effet, des facteurs génétiques sont impliqués dans l'addiction à la nicotine, la bronchite chronique, la fonction pulmonaire et le développement initial de l'appareil respiratoire. De plus, certaines modifications épigénétiques sont impliquées dans la pathogenèse de la BPCO [74], [75].

3.2.2. Physiopathologie

L'inhalation de substances irritantes entraîne l'activation des cellules épithéliales, notamment via les PRR, et conduit à la sécrétion de diverses cytokines et facteurs de croissance pro-inflammatoires (e.g. $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL8, GM-CSF, MCP-1, RANTES). Une réaction inflammatoire s'en suit avec une infiltration de lymphocytes Th1 et T CD8, de macrophages et de neutrophiles dans les poumons, induisant la sécrétion de protéases (e.g. élastase, cathepsin G, métalloprotéases (MMP) et d'ERO [76]. L'activité protéasique et oxydante détruit les tissus alvéolaires, et notamment les fibres d'élastines, qui constituent la paroi des alvéoles. L'élastine étant responsable de la structure alvéolaire, et de leur gonflement/compression lors de la respiration, les alvéoles se dilatent et la capacité d'expiration (VEMS) est diminuée. C'est l'emphysème. L'inflammation chronique cause un remodelage progressif de la

muqueuse respiratoire, c'est la bronchite chronique (Figure 12). Le remodelage tissulaire est irréversible. Il est caractérisé par une métaplasie squameuse (ou malpighienne) de l'épithélium (Figure 10) qui remplace progressivement les cellules épithéliales fonctionnelles par des cellules basales, et une fibrose pérbronchiolaire [72,74] qui rigidifie les bronchioles. La fibrose est une hypertrophie du tissu conjonctif présent sous l'épithélium (notamment des fibres de collagènes), liée à la prolifération des fibroblastes sur les sites lésés, et leur différenciation en myofibroblastes. Elle est notamment médiée par l'activation du TGF- β , et pourrait être amplifiée par la métaplasie squameuse [77]. Le remodelage entraîne également une hyperplasie des cellules caliciformes et une hypertrophie des glandes sous muqueuses, des phénomènes responsables de l'hypersécrétion muqueuse [60]. L'hypertrophie des glandes induit une augmentation de la concentration en mucines et une déshydratation du mucus en augmentant sa viscosité [35]. L'hypersécrétion de mucus et la fibrose des petites voies respiratoires causent l'obstruction bronchique, tandis que l'emphysème altère la fonction des alvéoles.

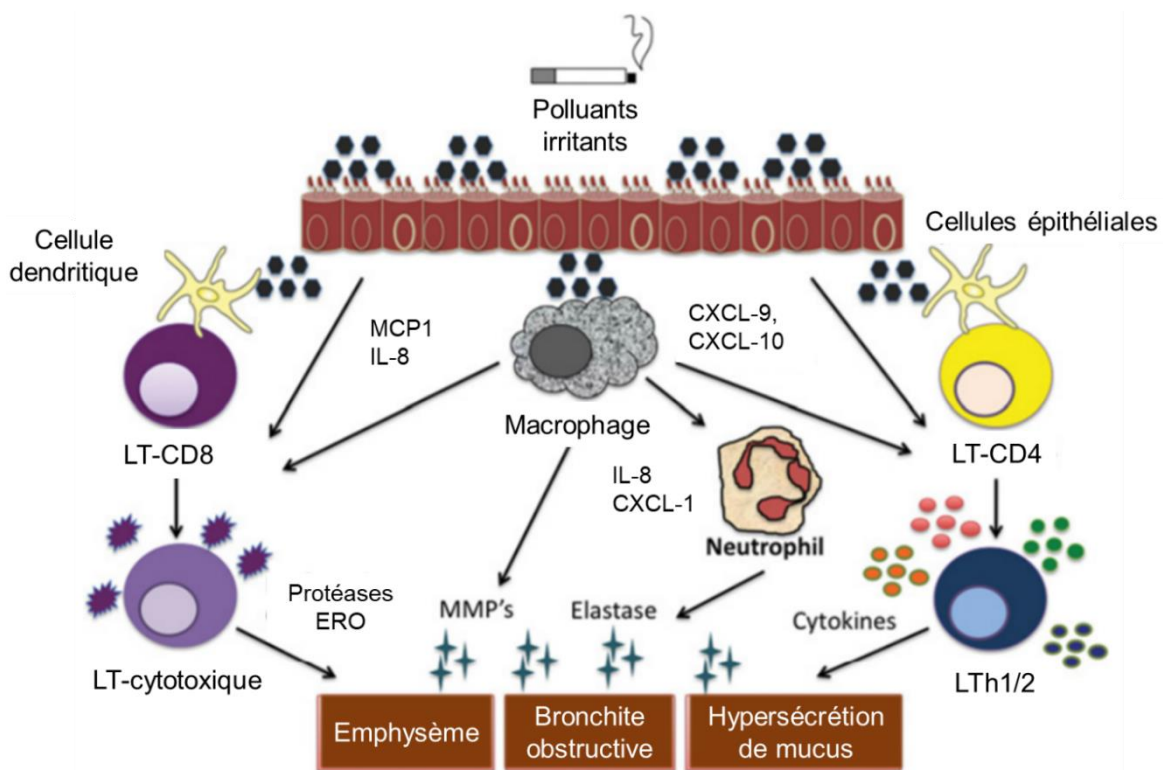


Figure 12 : Cellules immunitaires impliquées dans la pathogenèse de la BPCO, modifié d'après Lane et al. [78]

L'emphysème et la bronchite chronique peuvent être associés dans la BPCO, notamment chez les fumeurs, même si cela n'est pas systématique. De plus, des études de cohorte ont montré que ces affections pouvaient être présentes chez des fumeurs ou anciens fumeurs sans signe de diminution de la fonction respiratoire [74]. Les mécanismes en cause dans la BPCO impactent la fonction mucociliaire et la clairance macrophagique [79–81]. De ce fait, la BPCO est souvent associée à une colonisation de bactéries dans les voies respiratoires, et les personnes atteintes sont plus sensibles aux infections. L'altération de la fonction macrophagique contribue aussi au maintien de l'inflammation par un défaut d'efferocytose, le processus par lequel les cellules immunitaires apoptotiques sont phagocytées par les macrophages [72,82]. Dans les poumons des personnes atteintes de BPCO, l'activité de l'histone désacétylase 2 (HDAC2), une enzyme qui inhibe l'expression de gènes pro-inflammatoires, est réduite [75]. Ce phénomène pourrait contribuer à maintenir constante et exacerber l'inflammation. Des auteurs anglais ont aussi émis l'hypothèse que l'inhibition d'HDAC2 pouvait expliquer la résistance de la BPCO et de l'asthme sévère aux traitements par corticoïdes, qui ciblent notamment HDAC2 pour réduire la réaction inflammatoire [83,84]. Les facteurs de risque tels que le tabac et les polluants de l'air ont des conséquences sanitaires systémiques, et la BPCO est une pathologie qui survient après 40 ans. C'est pourquoi elle est souvent associée à une inflammation systémique et à des comorbidités, notamment d'ordre allergique, cardiovasculaire ou métabolique (diabète) [85,86]. De plus, le manque d'oxygénation des tissus est souvent compensé par une hypertension artérielle pulmonaire, qui peut aggraver l'obstruction bronchique.

3.3. Asthme et BPCO : deux pathologies inflammatoires chroniques différentes

L'asthme et la BPCO affectent une partie significative de la population. Ce sont des pathologies inflammatoires chroniques ayant pour conséquence une diminution de la fonction respiratoire, généralement réversible dans l'asthme intermittent, et partiellement irréversible dans l'asthme sévère et la BPCO. Ces bronchopneumopathies chroniques sont toutes deux caractérisées par une infiltration de cellules immunitaires responsable d'une réaction inflammatoire excessive, et par

des modifications structurelles des voies respiratoires, associées à une diminution du flux d'air. Toutefois, les caractéristiques observées lors de l'inflammation et du remodelage tissulaire diffèrent entre ces deux pathologies (Figure 13). Dans l'asthme, les lymphocytes Th2, les éosinophiles et les mastocytes sont prédominants tandis que dans la BPCO, ce sont les lymphocytes Th1 et T CD8, les macrophages et les neutrophiles qui prédominent. Concernant le remodelage tissulaire, les deux pathologies induisent un épaissement de la muqueuse respiratoire, davantage au niveau bronchique dans l'asthme et bronchiolaire dans la BPCO, ainsi qu'une hypertrophie des glandes à mucus, une hyperplasie des cellules caliciformes et une obstruction respiratoire causée par l'exsudat inflammatoire et l'hypersecretion de mucus. L'hyperréactivité bronchique, l'épaississement de la membrane basale et du muscle lisse bronchique sont des éléments caractéristiques de l'asthme alors que la métaplasie squameuse, la fibrose péribronchiolaire et la destruction des parois alvéolaires sont décrits dans la BPCO. Toutefois, la distinction entre ces deux pathologies n'est pas toujours évidente. En effet, l'infiltration neutrophilique est également observée dans certaines formes d'asthme. De plus, certains patients atteints de BPCO présentent également une infiltration éosinophilique qui pourrait être orchestrée par les ILC2 via la sécrétion d'IL-33 par les cellules épithéliales. Ces patients répondent généralement mieux à la corticothérapie. Alors que les symptômes asthmatiques surviennent davantage chez les enfants et les jeunes adultes, la BPCO touche plus communément les adultes de plus de 40 ans, et il devient plus complexe de distinguer ces deux pathologies avec l'âge. Environ 10 % des patients présenteraient des symptômes des deux pathologies [87]. Ce syndrome de chevauchement a été reconnu en 2014 et nommé Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS) par un consensus des organisations Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) et Global Initiative for Asthma (GINA). Les patients asthmatiques ayant progressé vers l'ACOS ont généralement un asthme d'apparition tardive et une fréquence d'exacerbation plus fréquente avant que la BPCO soit diagnostiquée [88].

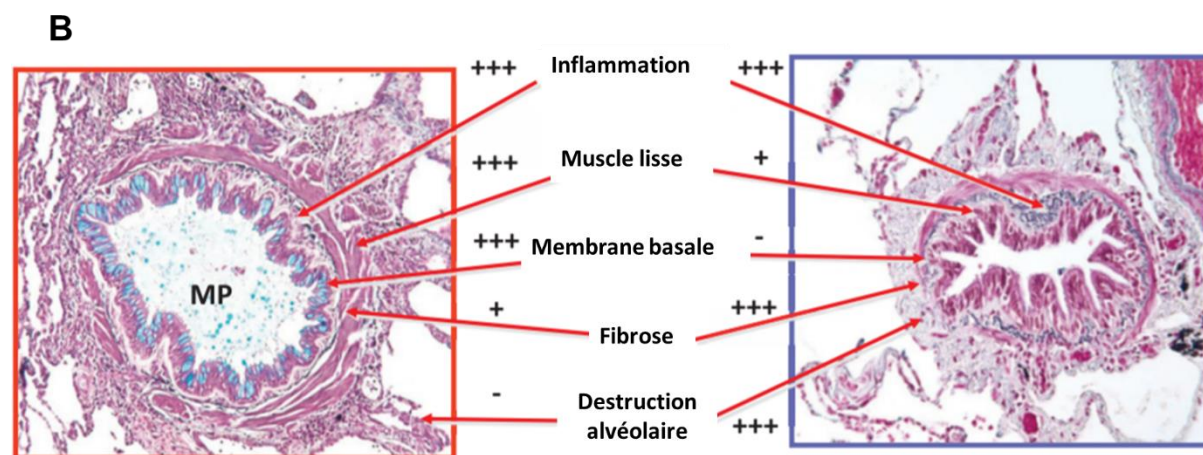
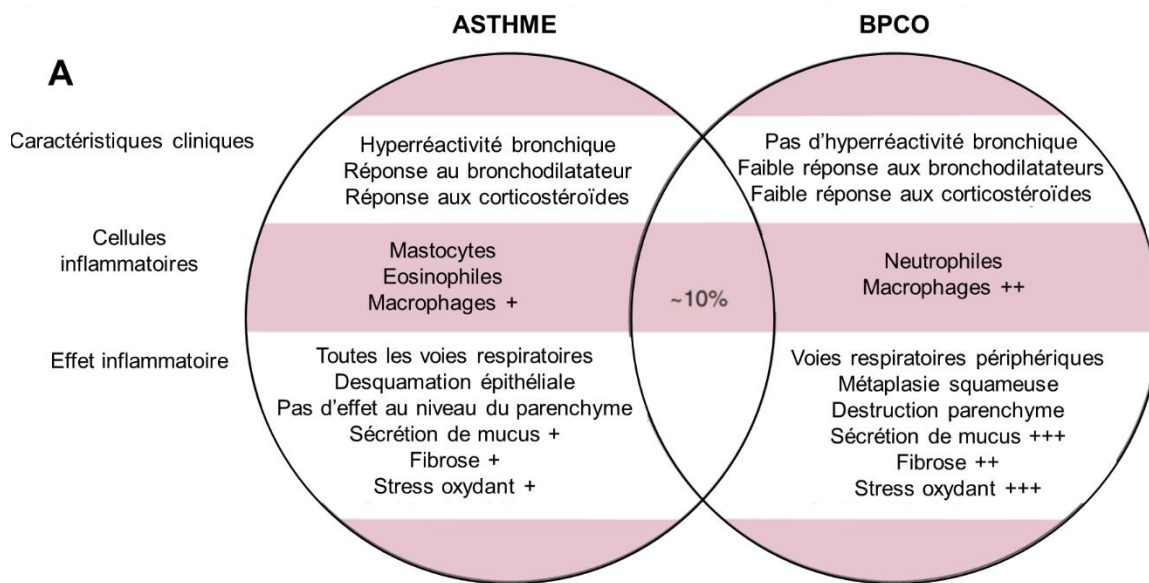


Figure 13 : (A) Synthèse sur les mécanismes physiopathologiques dans l'asthme et la BPCO. Approximativement 10% des patients présentent des symptômes des deux pathologies, modifié d'après Lumb [56]. (B) Caractéristiques histologiques des voies respiratoires dans l'asthme et la BPCO, modifié d'après Barnes [86]

3.4. Dysfonction mitochondriale et bronchopneumopathies chroniques (BPC)

Des études récentes suggèrent que les mitochondries jouent un rôle clef dans la pathogenèse des BPC. Dans ce contexte, un intérêt croissant est porté sur le ciblage thérapeutique des mitochondries dans la prise en charge de ces pathologies.

3.4.1. Fonction mitochondriale et stress oxydant

Les mitochondries sont les usines énergétiques des cellules. La phosphorylation oxydative (OXPHOS) est le processus par lequel les mitochondries consomment de l'oxygène pour générer la chaîne de transport des électrons à partir de l'oxydation des substrats issus du métabolisme cellulaire (e.g. Nicotinamide adénine dinucléotide (NADH,H⁺), Flavine adénine dinucléotide (FADH₂)). Les électrons transitent au niveau des différents complexes de la chaîne respiratoire situés dans la membrane interne, et génèrent une force protomotrice à l'origine d'une différence de potentiel ($\Delta\Psi_m$) entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire. Cette force protomotrice est consommée par l'ATP synthase pour phosphoryler l'Adénosine Diphosphate (ADP) en Adénosine Triphosphate (ATP). La chaîne respiratoire mitochondriale est la principale source d'ERO endogènes. En effet, une petite partie des électrons de la chaîne respiratoire est captée par les molécules d'O₂, ce qui aboutit à leur réduction en anion superoxyde (O₂⁻) au niveau des complexes I et III [89] (Figure 14).

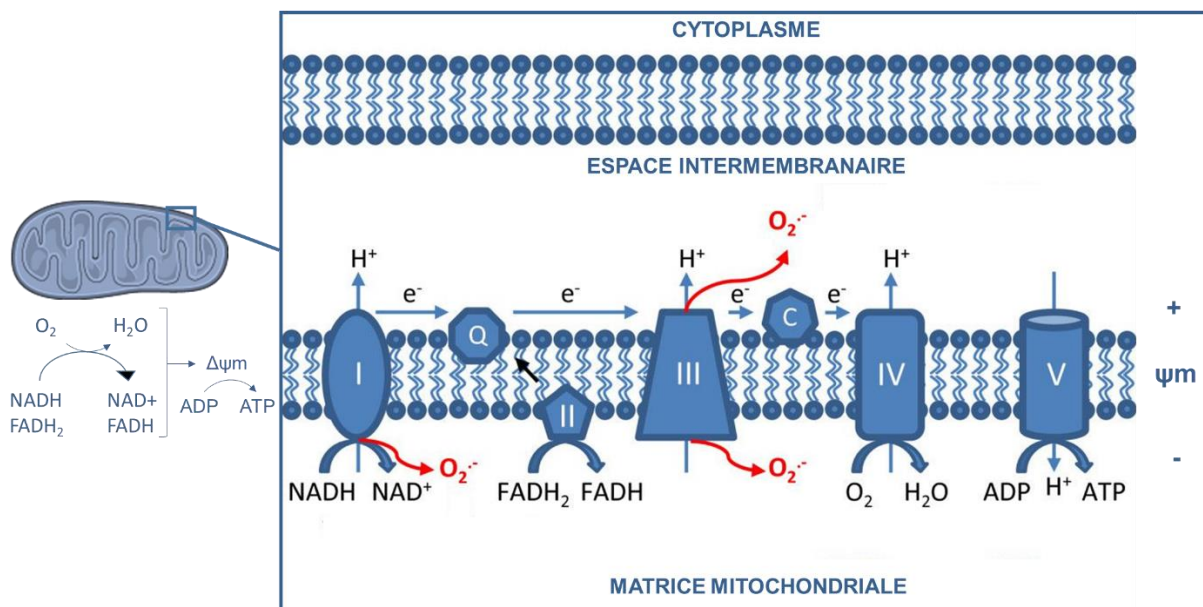


Figure 14 : Chaîne respiratoire mitochondriale et formation des ERO mitochondriaux. Les électrons (e⁻) issus de l'oxydation du NADH et du FADH₂ transitent dans la chaîne de transport des électrons et réduisent O₂ en H₂O au niveau du complexe IV. L'ATP synthase (V) utilise la force protomotrice pour produire l'ATP. Les ERO mitochondriaux (O₂⁻) sont produits par la fuite des électrons au niveau des complexes I et III qui aboutit à la réduction de l'O₂ en O₂⁻, modifié d'après Li et al., 2013 [90]

En condition physiologique, les ERO mitochondriaux (EROM) permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire en agissant comme seconds messagers. Une production modérée d'EROM est finement régulée par l'activation de la réponse anti-oxydante, médiée notamment par le facteur de transcription NF-E2-related factor 2 (nrf2) et la voie nrf2-ARE. A l'état quiescent, l'activité transcriptionnelle de nrf2 est inhibée par sa liaison à la protéine Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP-1) qui facilite sa dégradation. En réponse à un stress oxydant modéré, nrf2 est libéré de sa liaison avec KEAP-1. L'activation de nrf2 induit sa translocation nucléaire, et sa liaison sur des séquences spécifiques de l'ADN nommées Antioxydant Responsive Element (ARE). La séquence ARE est présente sur le site promoteur de gènes codant pour diverses enzymes anti-oxydantes telles que l'Hème Oxygénase-1 (HO-1), la NADPH Quinone Oxydoréductase 1 (NQO-1) ou encore la Glutamate Cysteine Ligase (GCL) [91,92]. La production d'EROM est accentuée en cas d'hypoxie, ou d'altération de l'OXPPOS. A un niveau de stress plus important, elle joue un rôle important dans la transduction du signal inflammatoire, notamment pour l'activation des facteurs de transcription HIF (hypoxia inducible factors) [93], NF- κ B via les p38 et JNK MAP-kinases [94,95], et l'activation de l'inflammasome NLRP3 [96]. De plus, certains éléments constitutifs des mitochondries, tel que l'ADN mitochondrial ou la cardiolipine, une protéine de la membrane interne des mitochondries, peuvent être libérés en cas de stress mitochondrial et être reconnus comme DAMP. Les DAMP mitochondriaux peuvent directement activer la réaction inflammatoire en interagissant avec les NLR cytoplasmiques, ou avec les TLR en cas de dommage de la membrane cellulaire [95]. Les résultats d'une étude montrent une diminution de l'IL-8 et du TGF β sécrétés par les cellules bronchiques de patients sains et atteints de BPCO après l'ajout d'un inhibiteur d'EROM (MitoQ) [97]. Dans cette même étude, des souris exposées à l'ozone ont déclenché une inflammation et une hyperréactivité bronchique. Le rétablissement de la fonction mitochondriale par l'administration de MitoQ a permis de diminuer l'hyperréactivité bronchique et l'infiltration de cellules immunitaires. En outre, une production accentuée d'O $_2^{\cdot-}$ a été montrée dans les zones du poumons stimulées par un allergène [98], et les dommages oxydatifs de l'épithélium contribuent à rendre les bronches hyperréactives [99–101]. Une autre étude a observé des dommages structuraux mitochondriaux et une altération de leur fonction dans des modèles de souris asthmatiques sensibilisées à l'ovalbumine. De manière intéressante, l'inhibition d'IL-4 (cytokine TH2) dans ces souris a permis de rétablir la fonction mitochondriale et

diminuer les dommages structuraux [102]. Lorsque le stress mitochondrial est trop important, les pores de transition de perméabilité mitochondriale s'ouvrent, le $\Delta\Psi_m$ est inhibé et les mitochondries déclenchent l'apoptose via la libération du cytochrome c [103]. Outre leur rôle énergétique fondamental, les mitochondries sont donc des organites senseurs de la disponibilité en O_2 et du stress oxydant. Elles régulent de multiples voies de signalisation impliquées dans la réponse anti-oxydante, la réaction inflammatoire et l'apoptose, en régulant l'homéostasie calcique, la production d'EROM et de DAMP mitochondriaux. La dysfonction mitochondriale peut aussi entraîner la sénescence cellulaire, qui joue un rôle important dans la pathogenèse de la BPCO [104]. Une production excessive d'EROM, témoignant d'un stress mitochondrial a été observé dans les cultures de tissus musculaires lisses bronchiques et de cellules épithéliales bronchiques de personnes atteintes de BPCO, ainsi que dans les tissus pulmonaires de souris exposées à l'ozone de manière chronique [97]. Une diminution des défenses anti-oxydantes (nrf2-ARE) a aussi été observée dans les tissus pulmonaires de personnes atteintes d'asthme [105,106] ou de BPCO [107]. Ces observations sont associées à une activité mitochondriale diminuée (OXPHOS, $\Delta\Psi_m$, [ATP]) [92,97,108]. De plus, un switch métabolique de l'activité OXPHOS vers une activité glycolytique, habituellement trouvé dans les cellules cancéreuses (effet Warburg) a aussi été rapportée dans les cas sévères de BPCO [109]. Sur les cellules épithéliales bronchiques, plusieurs études ont montré qu'une exposition cytotoxique à la fumée de cigarette diminuait la respiration mitochondriale, tandis qu'une exposition à des doses non cytotoxiques pouvait augmenter la masse mitochondriale et la respiration [92]. Une masse mitochondriale plus importante a aussi été observée dans l'épithélium bronchique d'enfants asthmatiques et de modèles de souris asthmatiques [106].

3.4.2. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organites dynamiques, organisés en réseau interconnecté. Le réseau mitochondrial change de forme, de taille et de localisation en fonction des besoins métaboliques de la cellule. Le cycle dynamique des mitochondries est essentiel pour nombre de processus physiologiques tels que la mitose, l'immunité cellulaire ou le contrôle qualité des mitochondries. Les mécanismes

à l'origine de ce cycle dynamique comprennent la fission et la fusion mitochondriale. La fission mitochondriale induit une fragmentation du réseau et génère de nouveaux organites nécessaires à la biogénèse mitochondriale. La fission permet de séquestrer les zones défectueuses du réseau pour initier leur élimination par mitophagie, ou faciliter l'apoptose quand la cellule subit un haut niveau de stress (Figure 15). La fission requiert le recrutement de la protéine cytoplasmique drp1 (dynamin-related protein 1) sur les récepteurs fis1 (mitochondrial fission protein 1) situés sur la membrane externe des mitochondries. Les protéines drp1 forment une structure en anneau autour de la zone de fission conduisant au rétrécissement puis à l'hydrolyse de la partie ceinturée. La fusion mitochondriale induit au contraire une élongation du réseau, et est associée avec une augmentation de l'activité OXPHOS. Elle est stimulée par une demande énergétique ou un stress et est abolie par une dissipation de $\Delta\Psi_m$. Elle permet l'accroissement de la masse et l'échange de composants entre les mitochondries (e.g. protéines, ADNm, complexes respiratoires). La fusion mitochondriale est médiée par les mitofusines (mfn1 et mfn2), et par la protéine optic atrophy 1 (OPA1) pour l'assemblage des membranes externes et internes respectivement (Figure 15). Ce cycle dynamique permet la maintenance de l'intégrité du réseau mitochondrial en éliminant les parties défectueuses ou les débris internalisés dans les mitochondries par mitophagie et en permettant la biogénèse mitochondriale, médiée notamment par les facteurs de transcription PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha) et Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1), à partir des mitochondries fissionnées [110–115].

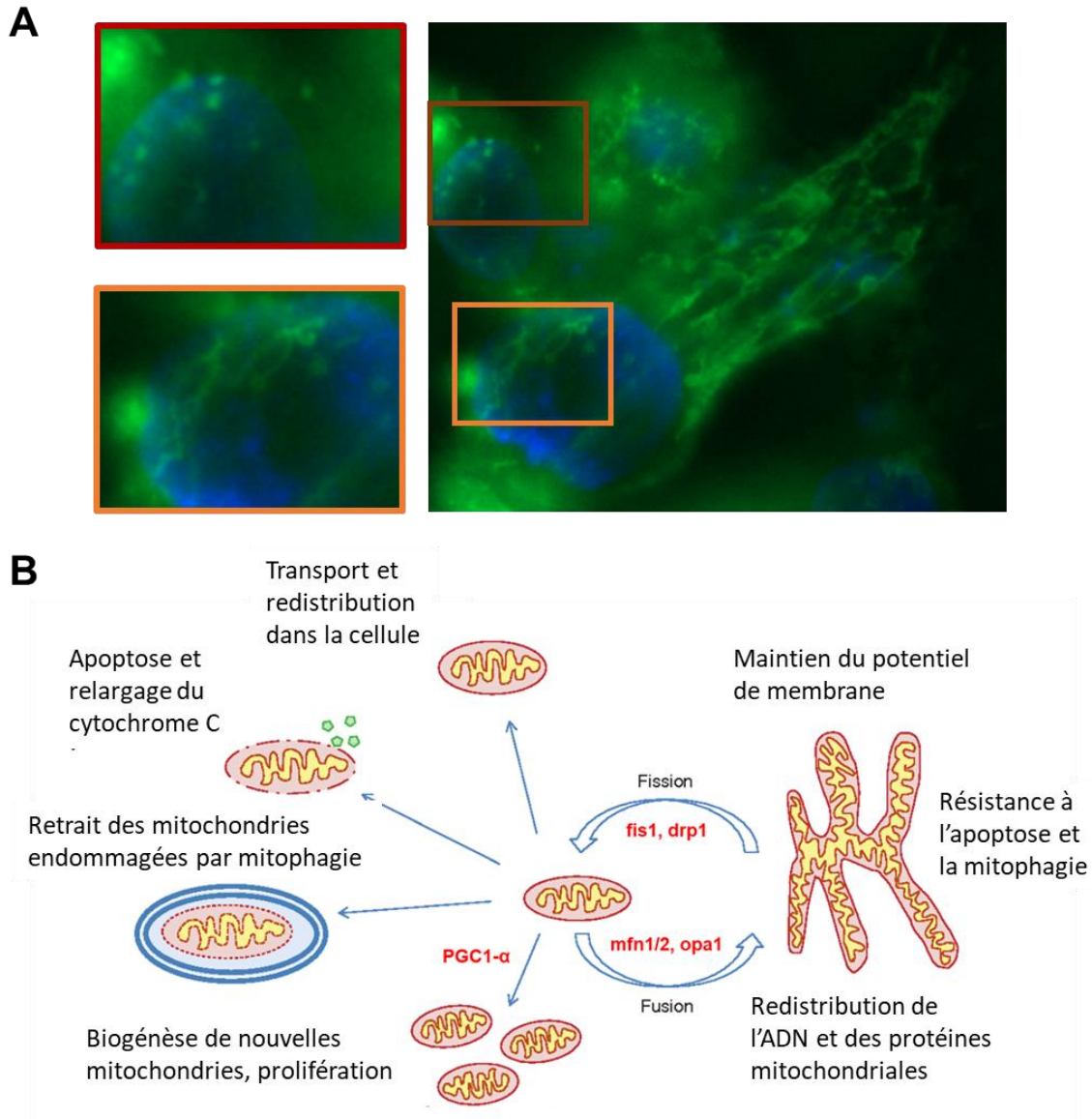


Figure 15 : (A) Mitochondries des cellules BEAS-2B marquées au mitotracker green (vert) et noyau marqué au Hoechst (bleu) (grossissement x400) (B) Cycle dynamique des mitochondries, modifié d'après Lennon et Salgia [116]

L'activité transcriptionnelle de PGC-1 α , est induite en réponse à une demande en ATP de la cellule. En condition physiologique, il est notamment induit par une exposition au froid ou lors d'un exercice d'endurance pour augmenter le métabolisme mitochondrial et compenser la perte d'énergie. Son expression est accentuée au cours du remodelage du muscle lisse dans l'asthme, ainsi que dans les poumons de personnes atteintes de BPCO à un stade modéré. Au contraire, une diminution de la biogénèse mitochondriale a été associée avec les cas sévères de BPCO [92,117,118], suggérant que PGC-1 α est un acteur important pour prévenir la progression de la

pathologie. L'induction de la biogénèse mitochondriale associée à une augmentation de la production d'énergie est un mécanisme d'adaptation de la cellule, activé en réponse à un stress. Cependant une augmentation de la biogénèse avec une fonction mitochondriale altérée et associée à une production excessive d'EROM peut perturber l'homéostasie [118]. Le stress cellulaire causé par la fumée de cigarette a aussi été associé avec une altération de la mitophagie, conduisant à l'accumulation de mitochondries défectueuses et à la senescence cellulaire [119]. L'administration d'un inhibiteur d'EROM (Mito-Tempo) a permis de rétablir la fonction mitophagique, diminuer la masse mitochondriale et retarder la senescence. L'équilibre fusion/fission mitochondrial dans les cellules pulmonaires semble aussi être perturbé par une exposition à la fumée de cigarette, ainsi que chez les personnes atteintes de BPCO et d'asthme sévère [92,108]. Les résultats d'une étude montrent qu'une exposition à une faible dose de fumée de cigarette sur des cellules épithéliales bronchiques induit une élongation du réseau mitochondrial (fusion). Au contraire, l'exposition à de plus fortes doses induit une fragmentation du réseau associé avec une diminution de la fonction mitochondriale [118].

Le stress mitochondrial semble être à la fois une cause et une conséquence de l'état oxydatif et inflammatoire chronique des poumons dans les bronchopneumopathies inflammatoires. Des altérations de la fonction respiratoire et du cycle dynamique des mitochondries ont été observées dans les tissus pulmonaires pathologiques, particulièrement dans la BPCO. Dans un contexte chronique, le dérèglement de la fonction mitochondriale peut contribuer à maintenir la réaction inflammatoire, notamment via la production d'EROM et la dérégulation de la réponse anti-oxydante. De plus en plus d'études s'intéressent aux dysfonctionnements de la mitochondrie comme cible thérapeutique dans les maladies pulmonaires chroniques [97,106,119–121].

4. Toxicité respiratoire des PM

L'évaluation des impacts sanitaires de la pollution de l'air est une problématique complexe pour plusieurs raisons. Les nombreux polluants de l'air interagissent entre eux dans un bouillon réactionnel catalysé notamment par les rayons UV et l'ozone (O₃), créant des synergies ou des antagonismes. Ce phénomène appelé « effet cocktail », rend imperceptible l'étude d'une composition chimique « statique » de l'air avec des effets toxicologiques associés bien définis comme c'est le cas pour l'étude d'une substance prise individuellement. Les caractéristiques physicochimiques des particules, et donc leurs propriétés toxicologiques, sont aussi largement dépendantes de l'environnement et des conditions météorologiques. De plus, le niveau d'exposition des individus varie en fonction de leur activité professionnelle, de leur mode de vie et du lieu d'habitation, etc. Outre le niveau d'exposition, la sensibilité d'un individu dépend également de son âge, de ses habitudes de vies, et de ses antécédents médicaux, notamment de la présence de pathologies sous-jacentes telles que l'asthme ou la BPCO.

4.1. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques, principalement menées depuis les années 1990, ont permis d'établir une corrélation certaine entre l'exposition aux PM et des conséquences sanitaires à court et long terme. Les modèles mettent en relation la concentration de polluants mesurée (ou modélisée) sur une échelle géographique plus ou moins fine, avec la survenue d'évènements sanitaires. Les études à court terme se font généralement par la mesure d'indicateurs de santé (hospitalisations, consultations médicales, mortalité) durant, et dans les jours/semaines qui suivent un épisode de pollution. Les études à long terme se basent sur des suivis de cohortes et mettent en relation l'exposition des sujets sur de longues périodes, souvent déduite du lieu d'habitation, avec l'incidence d'évènements de santé au sein de la cohorte (apparitions ou exacerbations de pathologies de type cardiovasculaires ou respiratoires, cancers, diminution de l'espérance de vie, ...).

4.1.1. Mortalité

La pollution de l'air est la première cause de mortalité d'origine environnementale dans le monde. L'OMS estime que la pollution de l'air est responsable de 16% des décès par cancer du poumon, 25% des décès par BPCO, 17% des décès pour cause cardiovasculaire et 26% des décès par infection respiratoire. En conséquence, elle causerait 4,2 millions de morts par an dans le monde. Une récente étude a réévalué ces chiffres en se basant sur un modèle intégrant des données météorologiques et d'interaction de l'atmosphère avec les océans, la terre et la biosphère (EMAC atmospheric chemistry–climate model). Ainsi, en prenant en compte la formation de polluants secondaires, l'étude estime le taux de mortalité global à 8,79 millions par an, dont 790000 en Europe [1]. Un risque accru de mortalité prématurée a également été montré avec des expositions à long terme à de faibles concentrations de particules fines ($PM_{2.5}$) inférieures aux seuils de recommandations de l'OMS de $10\mu g/cm^3$ [122,123]. Le risque est inégalement réparti. Les fortes densités de population combinées aux concentrations élevées de polluants de l'air en Asie du sud-est et dans le pacifique oriental en font les principales régions affectées [124] (Figure 16).

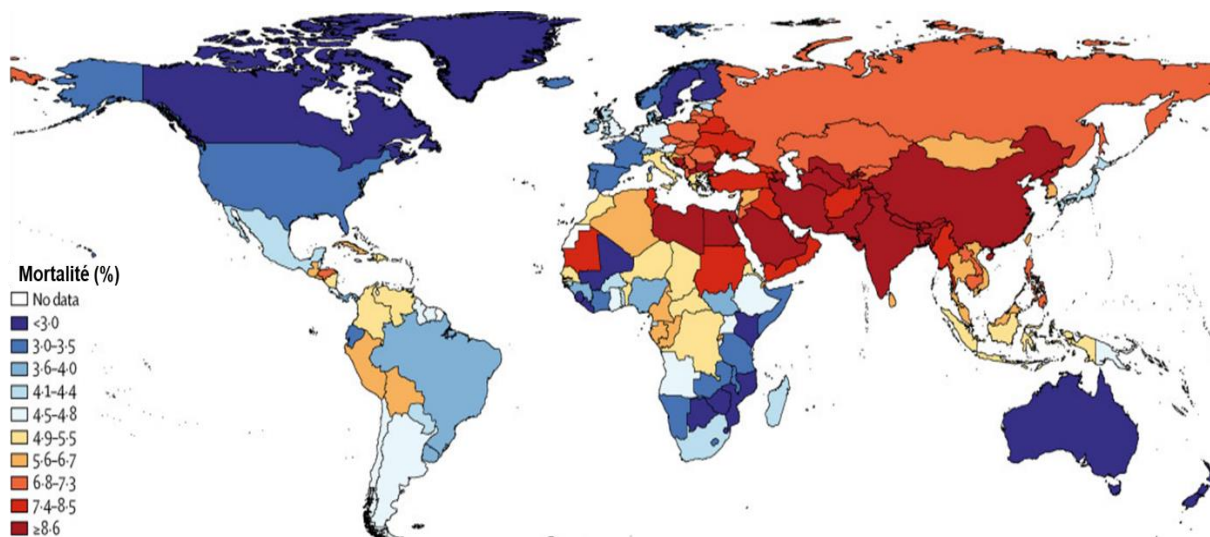


Figure 16 : Mortalité attribuable à une exposition à long terme aux $PM_{2.5}$, modifié d'après Cohen et al. [124]

En France, la pollution aux $PM_{2.5}$ d'origine anthropique serait responsable de 9% de la mortalité, avec 48283 morts par an [6], ce qui en fait la 3^{ème} cause de mortalité

en France derrière le tabac et l'alcool. A titre de comparaison, les accidents de la route ont causé 3 684 morts en 2017 d'après l'observatoire national interministériel de la sécurité routière. Bien que ces chiffres résultent généralement d'une exposition chronique à la pollution atmosphérique, des effets sur la mortalité à court terme ont également été décrits. Parmi ceux-ci, une association positive entre les concentrations journalières en PM_{2.5} et les décès survenant dans les 2 jours (lag 01) pour causes respiratoires [125,126], accidents vasculaires cérébraux [127] et infarctus du myocarde [128]. Les corrélations sur la mortalité à court terme sont les plus consistantes le jour suivant l'exposition dans le cas des causes respiratoires et le jour même dans le cas des causes cardiovasculaires [129]. Toutefois, ces associations restent significatives plus d'un mois après l'exposition. L'importance des corrélations décroît moins rapidement dans le cas de la mortalité pour causes respiratoires que pour la mortalité cardiovasculaire [130]. Cette mortalité à court terme touche particulièrement les populations sensibles, comme les personnes âgées, diabétiques ou présentant une affection chronique respiratoire ou cardiovasculaire [131]. Une étude montre également une association positive entre les concentrations en PM_{2.5} et la mortalité infantile ou post-néonatale [132].

4.1.2. Morbidité respiratoire

De nombreuses études épidémiologiques ont établi un lien entre le niveau d'exposition aux PM et le nombre d'admissions hospitalières ou de visites médicales pour des symptômes respiratoires dans les jours qui suivent. Les polluants gazeux tels que l'O₃, le SO₂ et le NO₂ sont également associés à l'augmentation du risque. Les affections à court terme les plus décrites sont l'exacerbation de bronchopneumopathies chroniques à composante inflammatoire telles que l'asthme [31,133,134], particulièrement chez les enfants, et la BPCO [126,134–137] (Figure 17). Les associations sont plus généralement plus importantes avec les PM_{2.5} qu'avec les PM₁₀, très peu d'études se sont intéressées à la fraction ultrafine. Les études montrent une augmentation du risque d'hospitalisation en lien avec la BPCO de 2 à 3 % pour une augmentation de 10 µg/m³ de PM_{2.5}. Le risque est augmenté chez les personnes âgées ou présentant des comorbidités, notamment de nature cardiovasculaire. Les PM sont également impliquées dans la survenue d'infection respiratoire aiguës.

L'exposition aux $PM_{2.5}$ à court terme a été positivement associée avec le risque d'hospitalisation pour des cas de pneumonie, d'influenza [138] et d'infection des voies respiratoires supérieures [139]. Le Global Health Observatory (GHO) de l'OMS estime que 17% des infections respiratoires dans le monde sont attribuables à la pollution atmosphérique.

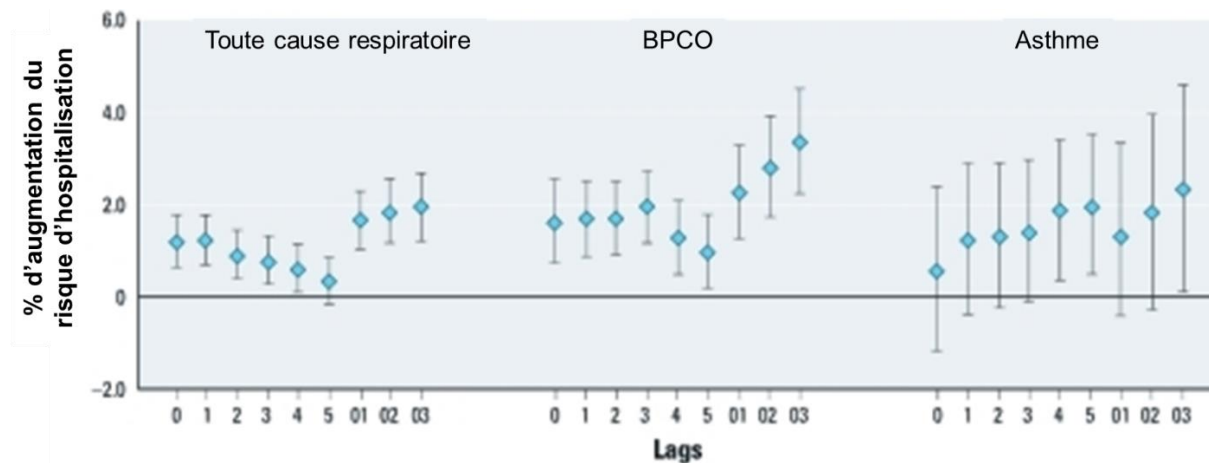


Figure 17 : Augmentation du pourcentage du risque d'hospitalisation pour causes respiratoires pour une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} (de lag 0 : le jour même à lag 5 : 5 jours après, et de lag01 : moyenne des deux premiers jours à lag03 : moyenne des premiers 4 jours). La concentration moyenne des PM_{10} pendant l'étude était de $56,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, modifié d'après Qiu et al. [134]

Outre l'exacerbation de pathologies préexistantes, l'incidence de nouveaux cas de BPC liée à une exposition à long terme a aussi été étudiée. Il est aujourd'hui largement démontré qu'une exposition à long terme à la pollution de l'air, et particulièrement aux $PM_{2.5}$, augmente le risque d'incidence du cancer du poumon [140–143]. D'après GHO, la pollution de l'air extérieure serait en cause dans 23% des cancers du poumon. De plus, la pollution atmosphérique et les PM sont toutes deux classées par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC) dans le groupe des cancérogènes certains (groupe 1) [143]. D'après certaines études et méta-analyses, l'exposition chronique à la pollution atmosphérique pourrait constituer un facteur de risque dans la prévalence de l'asthme dans la population générale [144,145]. Cependant, les preuves sont limitées, d'autant que certaines études ne trouvent pas d'associations positives [146]. Dans le cas de la BPCO, une étude chinoise montre une forte association entre son incidence et des expositions chroniques à de fortes concentrations de $PM_{2.5}$ [147]. Plusieurs études décrivent un

déclin de la fonction respiratoire consécutif à une exposition chronique [148,149], et une corrélation positive avec l'incidence de la BPCO à des concentrations en PM plus modérées [149,150]. En outre, les individus asthmatiques exposés à des concentrations plus importantes de PM_{2.5} ont un risque près de 3 fois supérieur (OR = 2,78) de progresser vers une BPCO et développer un syndrome de chevauchement (ACOS) [88]. Toutefois, les méthodes de mesure de l'exposition à long terme, le niveau d'exposition des sujets, ainsi que la définition de la BPCO sont très variables en fonction des études. Certains auteurs définissent l'incidence de la BPCO comme la première hospitalisation causée par cette maladie, tandis que d'autres utilisent des seuils de fonction ventilatoire (VEMS/CVF). Il est aussi complexe de distinguer clairement les effets aigus et ceux à long terme dans le développement des mécanismes pathologiques à l'origine des BPC. Malgré des mécanismes biologiques plausibles et des preuves évidentes sur la toxicité respiratoire et l'exacerbation des BPC causée par les PM, les preuves semblent encore limitées pour affirmer le rôle de la pollution de l'air dans l'incidence de nouveaux cas d'asthme ou de BPCO chez l'adulte [150]. Le GHO estime tout de même que la pollution atmosphérique est en cause dans 43% des BPCO.

Les enfants, chez qui l'appareil respiratoire est encore immature constituent une population sensible. Plusieurs études de cohorte ont montré des associations relativement fortes entre l'exposition aux PM_{2.5} durant les 4 à 6 premières années de vie et la fréquence des infections ORL ainsi que des épisodes de respiration sifflante. Ces mêmes études mettent en évidence une association avec l'incidence accrue de pathologies atopiques (asthme, rhinite allergique, sensibilisation aux allergènes communs) et parfois une augmentation du taux d'IgE [151–153]. L'exposition aiguë aux PM₁₀ a également été associée avec une augmentation du risque de rhinite allergique chez l'adulte à Pékin, avec une corrélation plus forte en saison chaude [154]. Les femmes enceintes et leur fœtus figurent aussi parmi les populations vulnérables. L'exposition des femmes enceintes durant la grossesse a été associée avec un risque accru de tachypnée transitoire et d'asphyxie du nouveau née [155]. Une exposition prénatale aux PM_{2.5} et aux PM_{0.1} durant le deuxième trimestre de grossesse a été associée avec une augmentation de l'incidence de l'asthme chez les enfants avant l'âge de 6 ans [156–158]. Les auteurs expliquent que cette phase de grossesse correspond à une phase importante du développement pulmonaire. L'exposition aux

PM_{2.5} durant le troisième semestre de grossesse a été associé avec un léger risque de retard croissance intra-utérin (OR de 1,09 pour une augmentation de 10 µg/m³) [159].

L'impact sanitaire de la pollution de l'air et notamment des particules atmosphériques est aujourd'hui avéré. Bien que le risque individuel soit relativement faible, l'ensemble de la population est concerné par cette problématique. De ce fait, la pollution atmosphérique engendrerait davantage de mort que le tabac dans le monde [1], même si le risque individuel lié à la consommation de tabac est supérieur. Le risque est inégalement réparti. Les fortes densités de population combinées aux concentrations élevées de polluants de l'air en Asie du sud-est et dans le pacifique oriental en font les principales régions affectées. En France, le coût sanitaire de la pollution atmosphérique a été estimé à 68 à 97 milliard d'euros par an [160]. Les populations à risques sont touchées en premier lieu. Elles comprennent les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et la population atteinte d'affections cardiorespiratoires. Toutefois, les études montrent que même à des concentrations modérées (inférieures aux recommandations de l'OMS), les particules atmosphériques et particulièrement les particules fines peuvent avoir un impact sanitaire sur la population générale [31–33]. De nombreuses études épidémiologiques et toxicologiques ont permis, de manière complémentaire, de mettre en évidence différents aspects de la toxicité cardiorespiratoire des particules atmosphériques. Malgré cela, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, notamment dans le cas de l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques, ne sont pas encore clairement définis et peu d'études se sont intéressées à la toxicité des particules ultrafines.

4.2. Etudes Toxicologiques

4.2.1. Les modèles utilisés en toxicologie des voies respiratoires

Les études toxicologiques sont utilisées pour identifier les mécanismes d'action toxiques des particules atmosphériques. Différents modèles expérimentaux sont utilisés pour reproduire l'exposition humaine aux polluants atmosphériques. Ces

modèles sont utilisés de manière complémentaire, pour confirmer la reproductibilité d'une observation, et comportent chacun des spécificités permettant d'étudier différentes problématiques [161] (Figure 18).

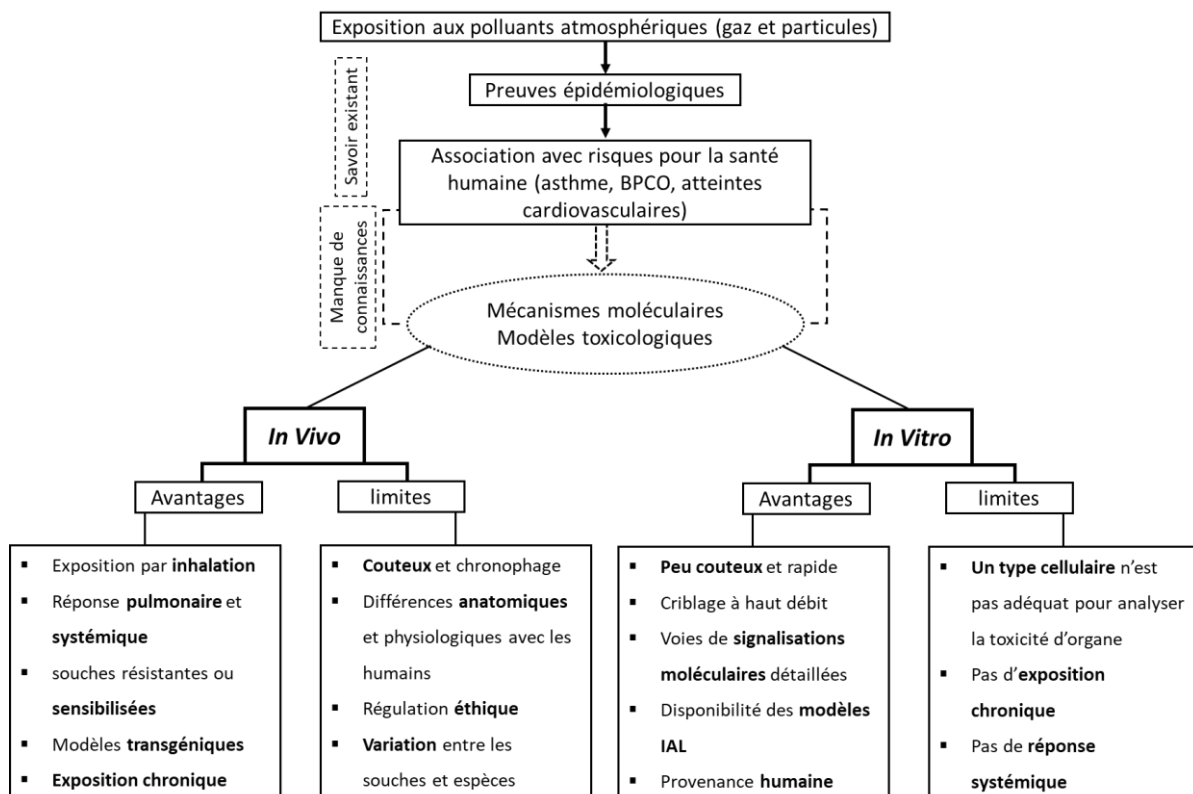


Figure 18 : Avantages et limites des modèles utilisés en toxicologie, modifié d'après Upadhyay et Palmberg [161]

4.2.1.1. Modèles animaux

Les études toxicologiques *in vivo* utilisent des animaux, principalement des souris ou des rats. Les particules peuvent être administrées en solution saline par voie nasale ou intratrachéale après anesthésie. Les aérosols peuvent aussi être générés dans une chambre d'exposition, ou être administrés directement par voie nasale après contusion des animaux (« nose only »). La technique du nose only permet de s'affranchir de l'absorption par voie digestive, les animaux ayant tendance à se lécher le pelage. L'utilisation de rongeurs permet notamment de mimer une exposition chronique et de prélever des échantillons d'intérêts (e.g. sang, lavage broncho-alvéolaire, poumons). Ces modèles animaux peuvent être utilisés pour étudier la distribution des particules atmosphériques dans l'organisme, observer d'éventuelles

modifications histologiques ou encore des effets systémiques. L'utilisation de souris sensibilisées ou transgéniques permet également de reproduire différents états pathologiques, tels que l'hyperréactivité bronchique retrouvée dans l'asthme [162], ou une déficience en α 1AT, cause génétique de l'emphysème pulmonaire [163]. L'utilisation de modèles animaux dans les études toxicologiques présente toutefois certaines limites. Outre une régulation éthique évidente, les études *in vivo* sont généralement coûteuses et chronophages. Les différences anatomo-physiologiques entre les humaines et les souris induisent aussi certaines limites dans l'interprétation des résultats et leur transposition à l'humain.

4.2.1.2. Modèles cellulaires

Les études *in vitro* utilisent des cultures cellulaires pour étudier la toxicologie des particules. Les modèles cellulaires peuvent être utilisés sans limitation d'ordre éthique et peuvent constituer une alternative aux modèles *in vivo*. Les modèles classiquement utilisés sont des lignées cellulaires immortelles provenant initialement d'une même souche. Les lignées cellulaires peuvent provenir de tissus tumoraux (e.g. lignée A549) ou être génétiquement modifiées (e.g. lignée BEAS-2B (Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B)) pour supporter un grand nombre de mitoses successives, sans perdre leur phénotype initial. Ces modèles présentent un grand intérêt pour leur facilité d'entretien/conservation, et peuvent être utilisés pour des criblages à haut débits. Toutefois, les lignées cellulaires perdent certaines fonctions spécifiques des tissus dont elles sont issues, telles que le contrôle du cycle cellulaire ou certaines fonctions métaboliques [164,165]. Elles sont de ce fait moins représentatives de la réalité physiologique. Les cellules primaires, ou primocultures, sont directement cultivées à partir d'explants de tissus pulmonaires, sans modification génétique. Elles ont une capacité de prolifération limitée et entrent en sénescence après quelques cycles de division. Les cellules primaires ont donc des exigences de culture plus importantes et ne peuvent pas être entretenues au-delà d'un certain nombre de divisions. Toutefois, ces cellules sont plus représentatives des conditions retrouvées *in vivo* [164,165] (Tableau 3). Une étude a notamment montré que la résistance de la barrière épithéliale (résistance transépithéliale) et l'expression des jonctions intercellulaires étaient plus importantes dans une culture de cellules

primaires que dans une culture de lignées cellulaires. Cette même étude a mis en évidence l'inefficacité des lignées cellulaires à rétablir leur rôle de barrière épithéliale et les jonctions cellules-cellules après une lésion tissulaire [166].

L'utilisation de plusieurs souches de cellules primaires issues de différents patients permet d'intégrer la variabilité interindividuelle dans les effets biologiques observés. Il est également possible d'intégrer une variabilité de réponse biologique émanant de l'état pathologique du donneur (e.g. asthme, BPCO).

Tableau 3 : Comparatif entre les lignées cellulaires et les cellules primaires

Lignées cellulaires	Cellules primaires
Transformées	Non transformées
Entretien/conservation +	Entretien/conservation -
Coût -	Coût +
Issues d'un seul donneur	Variabilité interindividuelle
Potentiel de différenciation modéré	Potentiel de différenciation important
Perte de fonction spécifique	Meilleur maintien de fonction spécifique
- représentatives de la réalité biologique	+ représentatives de la réalité biologique

L'épithélium bronchique peut être reconstitué *in vitro* en cultivant les cellules primaires à l'interface air liquide (IAL). Cette technique de culture cellulaire permet de maintenir le pôle apical des cellules à l'air libre pour reproduire les conditions physiologiques des voies respiratoires. En étant nourries par le pôle basal, les cellules se différencient en plusieurs types cellulaires (cellules ciliées, cellules caliciformes, cellules basales) et reproduisent ainsi la barrière épithéliale et la fonction mucociliaire [167] (Figure 19). Cette technique de culture permet aussi d'administrer directement les particules sur le pôle apical des cellules sans les diluer dans le milieu de culture.

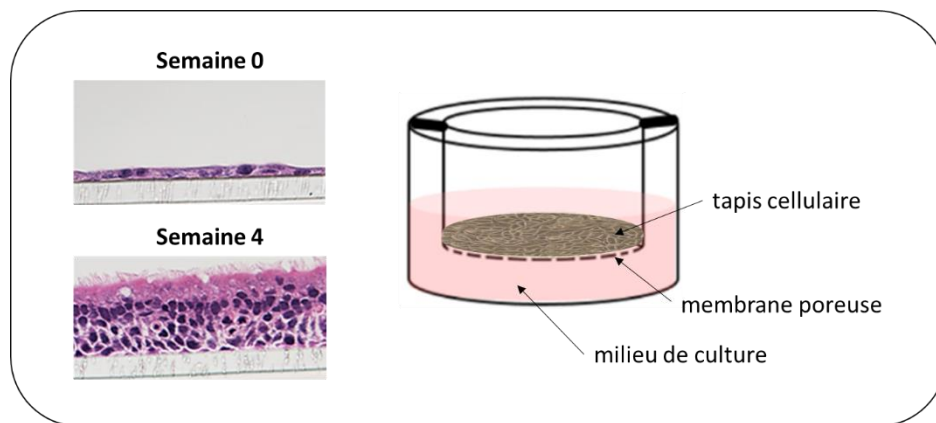


Figure 19 : Culture de cellules bronchiques à l'interface air liquide et reconstitution de l'épithélium *in vitro*, modifié d'après Rayner et al. [167]

Une étude a montré que les cellules primaires bronchiques différenciées à l'IAL ont un profil d'expression génique similaire à celui de l'épithélium bronchique *in vivo*, tandis que les cellules primaires non différenciées ont un profil plus proche de celui des lignées cellulaires [168]. Les cellules différenciées à l'IAL ont aussi une réponse biologique aux PM plus faible que les cellules cultivées de manière classique. D'après les auteurs, ce phénomène serait notamment lié à une disponibilité accrue en oxygène lors de la culture à l'IAL [169]. En outre, la résistance accrue des cellules différenciées à l'IAL pourrait provenir d'une meilleure capacité fonctionnelle liée à la reconstitution du phénotype mucociliaire et de la barrière épithéliale.

4.2.2. Toxicocinétique

4.2.2.1. Dépôt des particules dans l'appareil respiratoire

Durant leur passage dans les voies respiratoires, les PM sont soumises à différents mécanismes physiques pouvant les faire quitter le flux d'air et se déposer à plusieurs niveaux (e.g. naso-pharyngé, trachéo-bronchique, alvéolaire). Il existe cinq mécanismes par lesquels les particules peuvent être adsorbées sur les parois du conduit respiratoire [170,171] (Figure 20 A). (1) La sédimentation, pour les particules les plus denses, soumises à la gravité, (2) l'impaction inertielle qui se produit quand une particule dévie lors d'un changement de direction du flux d'air et entre en contact avec une paroi de l'arbre respiratoire. La probabilité d'impaction augmente avec la taille de la particule, sa densité et la durée du cycle respiratoire. Cette loi physique est

notamment utilisée pour prélever des particules de taille et de densité désirées à l'aide d'impacteurs en cascade. (3) La diffusion qui est régie par le mouvement brownien. C'est le mécanisme de dépôt le plus important pour les particules ultrafines. (4) L'interception, qui survient particulièrement avec les particules allongées (fibreuses), lorsqu'un bord de la particule entre en contact avec les tissus. (5) L'attraction électrique, pour les particules chargées, considérée comme négligeable car les aérosols de particules comportent généralement une distribution des charges neutre.

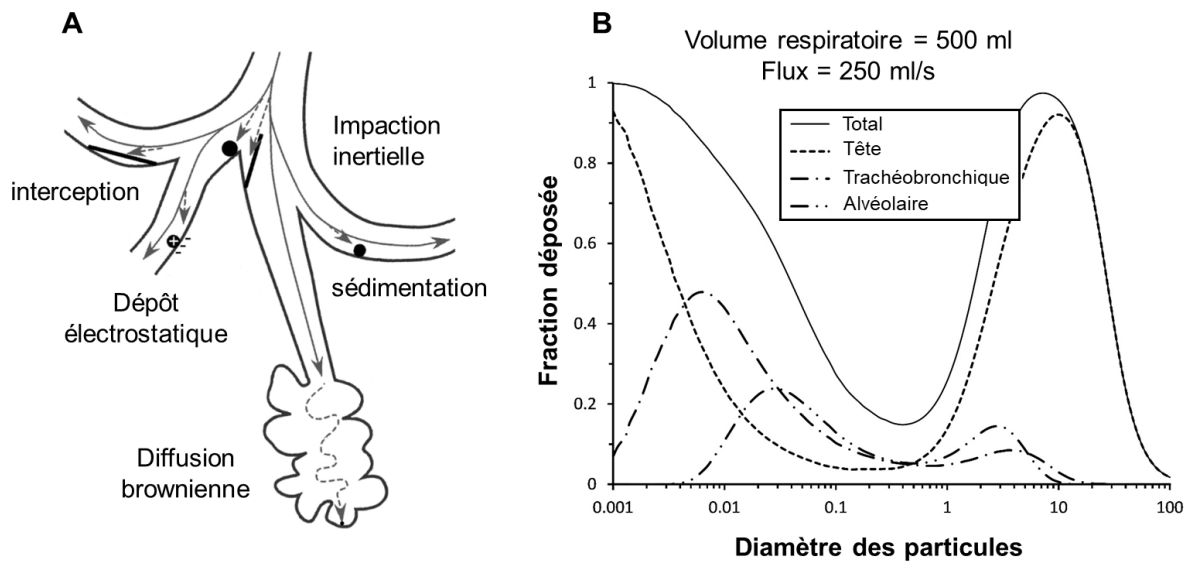


Figure 20 : (A) Mécanismes de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire, modifié d'après Fröhlich et Salar-Behzadi, 2014 [170]. (B) Région de dépôt des particules en fonction de leur taille, pour un cycle respiratoire normal, modifié d'après l'US-EPA [172].

L'impaction est le mécanisme prédominant dans les voies respiratoires supérieures où le flux d'air est plus rapide. A l'inverse, dans les alvéoles, les particules sont préférentiellement déposées par diffusion ou par sédimentation. Les particules les plus grosses ayant une vitesse importante sont déposées principalement par impaction tandis que les petites sont principalement déposées par diffusion, dû à un temps de résidence plus long dans les poumons. Ce phénomène est à l'origine d'une courbe en U caractéristique représentant la fraction de l'aérosol déposé en fonction de la taille des particules [171,173,174] (Figure 20 B). La fraction de l'aérosol déposée et la région de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire dépendent de trois types de paramètres : (1) Le comportement aérodynamique et physicochimique des particules lié à leurs caractéristiques intrinsèques (e.g. densité, charge, taille, forme,

caractère hydrophile/hydrophobe), (2) la morphologie et la structure géométrique des voies respiratoires, et (3) les caractéristiques du cycle respiratoire [170,171]. Ces deux derniers paramètres peuvent induire une variabilité interindividuelle dans la fraction déposée des particules inhalées [173]. En outre, les perturbations du flux d'air dues à l'obstruction des bronches chez les personnes atteintes de BPC conduisent à une augmentation du dépôt des particules inhalées dans l'asthme [175] et la BPCO [176,177]. Dans la BPCO, ce phénomène peut aussi être expliqué par des cycles respiratoires plus long et un débit expiratoire amoindri conduisant à une augmentation du temps de transit des particules dans les voies respiratoires.

4.2.2.2. Clairance et translocation des particules

Suite à leur dépôt dans l'appareil respiratoire, les composés solubles interagissent avec les tissus ou sont rapidement métabolisés. Cette fraction soluble a la durée de vie la plus courte. Elle comprend des HAP et des métaux qui peuvent diffuser dans l'organisme et être retrouvés dans le foie après inhalation [178]. L'efficacité de la clairance pulmonaire des composés insolubles dépend en grande partie de leur région de dépôt dans l'appareil respiratoire. C'est au niveau trachéo-bronchique qu'elle est la plus rapidement effective et efficace avec l'ascenseur mucociliaire et le réflexe de toux. Dans la région alvéolaire, l'élimination est assurée par phagocytose via les macrophages alvéolaires, un mécanisme beaucoup plus lent. Les particules peuvent y persister durant des mois et s'y accumuler [9]. L'accumulation des particules ultrafines dans les alvéoles pulmonaires, impacte l'activité phagocytaire des macrophages par saturation. Les particules ultrafines non phagocytées subsistent dans les voies respiratoires et altèrent la clairance alvéolaire des substances inorganiques et des microorganismes [179]. Les PM causent donc une baisse de l'immunité des voies respiratoires par inhibition de la phagocytose. Ce mécanisme pourrait être en cause dans l'exacerbation de la BPCO, souvent d'origine virale [72]. L'efficacité de clairance des particules est plus faible chez les patients atteints de bronchopneumopathies chroniques. Le remodelage bronchique impacte l'activité du tapis mucociliaire, tandis que la fonction de phagocytose des macrophages est altérée dans l'asthme sévère [68] et la BPCO [79–81]. Une étude dans laquelle des sujets fumeurs, non-fumeurs ou atteints de BPCO inhalaient des nanoparticules (100 nm)

radio-marquées a permis de montrer une rétention plus importante de particules ultrafines dans les poumons des personnes atteintes de BPCO [177] (Figure 21).

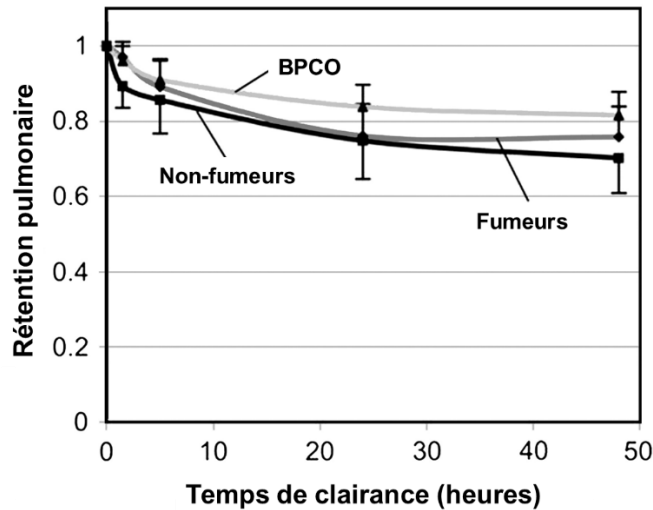


Figure 21 : Rétention pulmonaire de nanoparticules radio-marquées mesurée à 10 minute, 1,5, 5,5, 24 et 48 heures après inhalation, modifié d'après Möller et al. [177]

La taille des PUF leur permet, d'être internalisées dans les cellules épithéliales et dans le tissu conjonctif [9,180], et en théorie, de traverser la barrière alvéolo-capillaire pour diffuser dans la circulation sanguine [11]. L'internalisation cellulaire des PUF ou des composés solubles induit leur interaction avec les récepteurs intracellulaires. Outre la clairance mécanique, l'activité métabolique dans les tissus pulmonaires permet également d'éliminer certains composés. L'activation de l'aryl hydrocarbon receptor (ahr) par les HAPs en est l'exemple le plus connu, et semble être l'une des cibles les plus précoces des particules issues de la combustion [181]. L'activation de l'ahr entraîne la transcription d'enzymes de phase I et II (e.g. Cytochromes P450 (CYP), NQO1, Aldehyde dehydrogenases (ALDH)) pour métaboliser les HAP. Des études expérimentales ont montré que les nanoparticules inhalées ou une partie (e.g. métaux) pouvaient rapidement diffuser dans la circulation sanguine des hamsters [182] des rats [183], des souris [178] et des humains [184]. Elles sont parfois retrouvées dans le foie et les reins [182] et pourraient migrer dans le système nerveux central via le nerf olfactif [185]. Toutefois, il n'y a actuellement pas de consensus sur la proportion de PUF pouvant être distribuées dans l'organisme et leur contribution aux effets sanitaires systémiques. D'autres études utilisant des

nanoparticules de carbone radio-marquées inhalées par des humains [177] ou des nanoparticules en polystyrène injectées en intra-trachéale à des lapins [186] n'ont pas trouvé de translocation significative des particules dans le sang ou dans le foie, malgré l'accumulation pulmonaire.

4.2.3. Mécanismes d'action toxique

4.2.3.1. *Stress oxydant*

Les ERO sont des molécules fortement instables et réactives car elles disposent d'un électron non apparié (e.g. $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, RO_2^{\cdot}). La stabilisation d'une ERO se fait par oxydation d'une molécule voisine qui devient à son tour une ERO et entraîne une réaction en chaîne. En condition physiologique, les ERO sont naturellement produits par des sources intracellulaires (e.g. chaîne respiratoire mitochondriale, NAD(P)H oxydases) et des sources extracellulaires (e.g. macrophages, neutrophiles) pour leur action antimicrobienne. L'action des ERO peut être inhibée par un panel de molécules anti-oxydantes (e.g. glutathion, HO-1, superoxyde dismutase). Le stress oxydant résulte d'une dérégulation de la balance pro/anti-oxydants et entraîne des dommages oxydatifs aux biomolécules. La peroxydation lipidique est responsable de la dégradation des membranes cellulaires, les dommages protéiques induisent une altération des fonctions cellulaires et l'oxydation de l'ADN peut conduire à la formation d'adduits mutagènes (e.g. 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-OHdG)). Les ERO interviennent dans la signalisation cellulaire. D'après le paradigme actuel, un stress oxydant modéré augmente l'activité anti-oxydante, notamment via l'activation de la voie nrf2-ARE pour rétablir l'homéostasie. A un niveau intermédiaire, le stress oxydant conduit à l'activation des MAPKs et de facteurs de transcription pro-inflammatoires (e.g. AP-1, NF- κ B). A un niveau important, le stress oxydant altère la perméabilité

membranaire des mitochondries et conduit à la mort cellulaire par apoptose [181,187] (Figure 22).

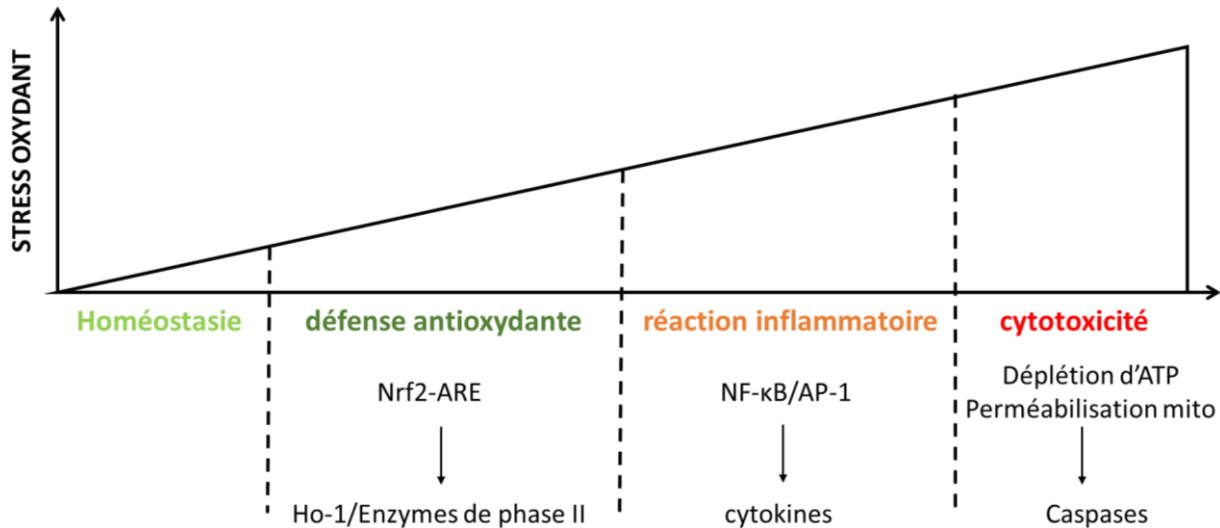


Figure 22 : Paradigme de la réponse hiérarchique au stress oxydant

L'induction d'un stress oxydant pulmonaire suivant l'exposition aux PM a été largement démontré *in vivo* et *in vitro*, à des doses non cytotoxiques [11,181,188–192]. Des marqueurs de stress oxydant associés à des lésions oxydatives de l'ADN ont été observés dans le sang, le foie et les reins de souris exposées à des doses concentrées de PM_{2.5} [193], et sur des lignées cellulaires (L-132) exposées 48h à une dose faiblement cytotoxique de PM [192]. Le stress oxydant est décrit comme étant à l'origine de nombreux effets toxiques des PM liés à l'inflammation, aux modulations épigénétiques et à la génotoxicité. Certains composés adsorbés sur les PM tels que les métaux et les HAP sont des sources connues d'ERO. D'après la réaction de Fenton, l'oxydation des métaux de transition (e.g. Fe, Cu, Cr) par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) conduit à la formation du radical hydroxyle (·OH), une espèce à fort potentiel oxydant. La métabolisation des HAP par les cytochromes P-450 conduit aussi à la formation de radicaux libres de type semi quinones [189]. Les PM sont donc une source d'ERO exogènes via la fraction soluble et la réactivité de surface des particules insolubles. La production d'ERO endogènes est aussi accentuée via un

stress mitochondrial, l'activation des oxydases membranaires et la réaction inflammatoire [181] (Figure 23).

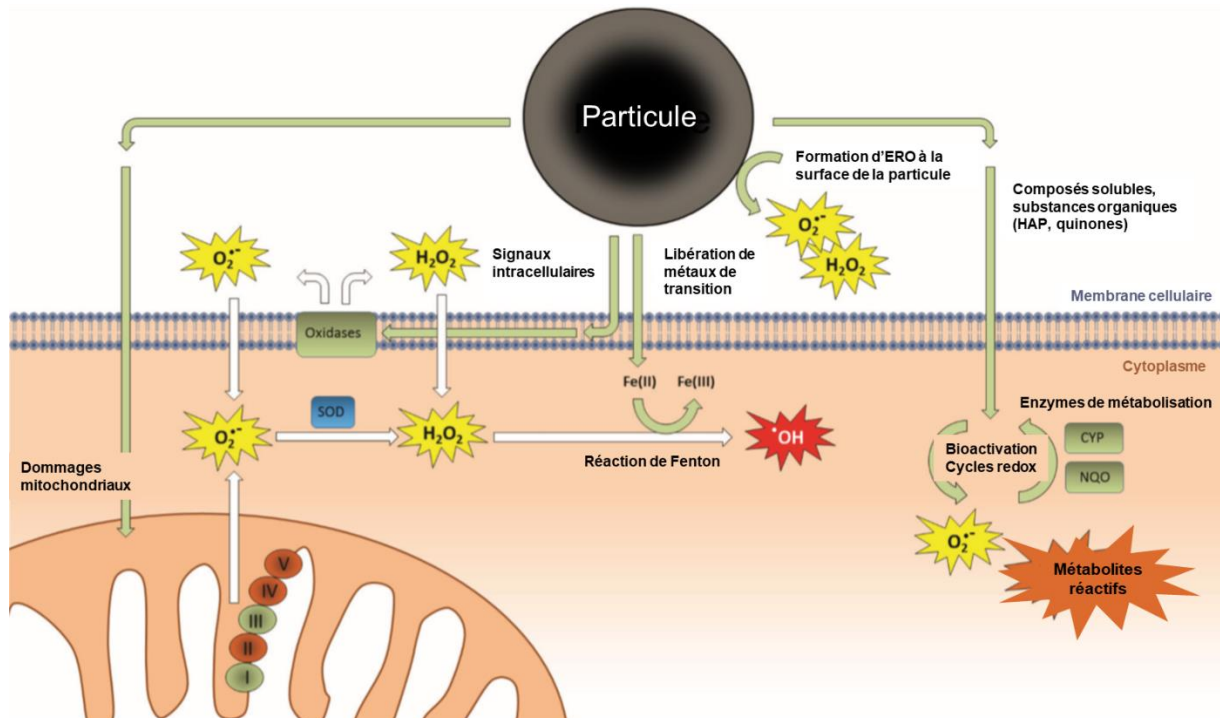


Figure 23 : Sources d'ERO causées par l'exposition de l'épithélium aux PM, modifié d'après Øvrevik et al. [181]

4.2.3.2. Inflammation

De nombreuses études ont montré qu'une exposition aux PM peut entraîner une réaction inflammatoire à des doses non cytotoxiques, via la sécrétion de cytokines et le recrutement de cellules immunitaires dans les poumons et dans le sang. La réaction inflammatoire peut être déclenchée par différents mécanismes (Figure 24). L'exposition *in vivo* et *in vitro* aux PM entraîne l'activation de récepteurs membranaires possédant une activité tyrosine kinase tel que l'epidermal growth factor receptor (EGFR) [194]. Plusieurs ligands sont capables d'activer différents domaines de l'EGFR (e.g. TGF- α , épiréguline, EGF, amphiréguline), ce qui entraîne sa dimerisation, et l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation en aval telles que PI3K-AKT, et RAS/MAPK impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire [41]. Les MAPK (ERK, JNK, p38 MAPK) sont activées à la suite d'un signal extracellulaire (e.g. EGFR) [190,191]. Elles conduisent, après une série de phosphorylations successives

(réaction en cascade) à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, régulateurs majeurs de la réaction inflammatoire [41,190,191]. En outre, des inhibiteurs des MAPKs ou des PI3K diminuent la sécrétion d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et GM-CSF induite par l'exposition de cellules épithéliales bronchiques aux PM [42]. Une autre étude a montré qu'un traitement préalable avec un anti-oxydant (N-acétylcystéine) atténue la réaction inflammatoire, et l'expression des MAPK [190]. Ces résultats indiquent que le stress oxydant est en partie responsable du déclenchement de l'inflammation via la voie des MAPK/NF- κ B.

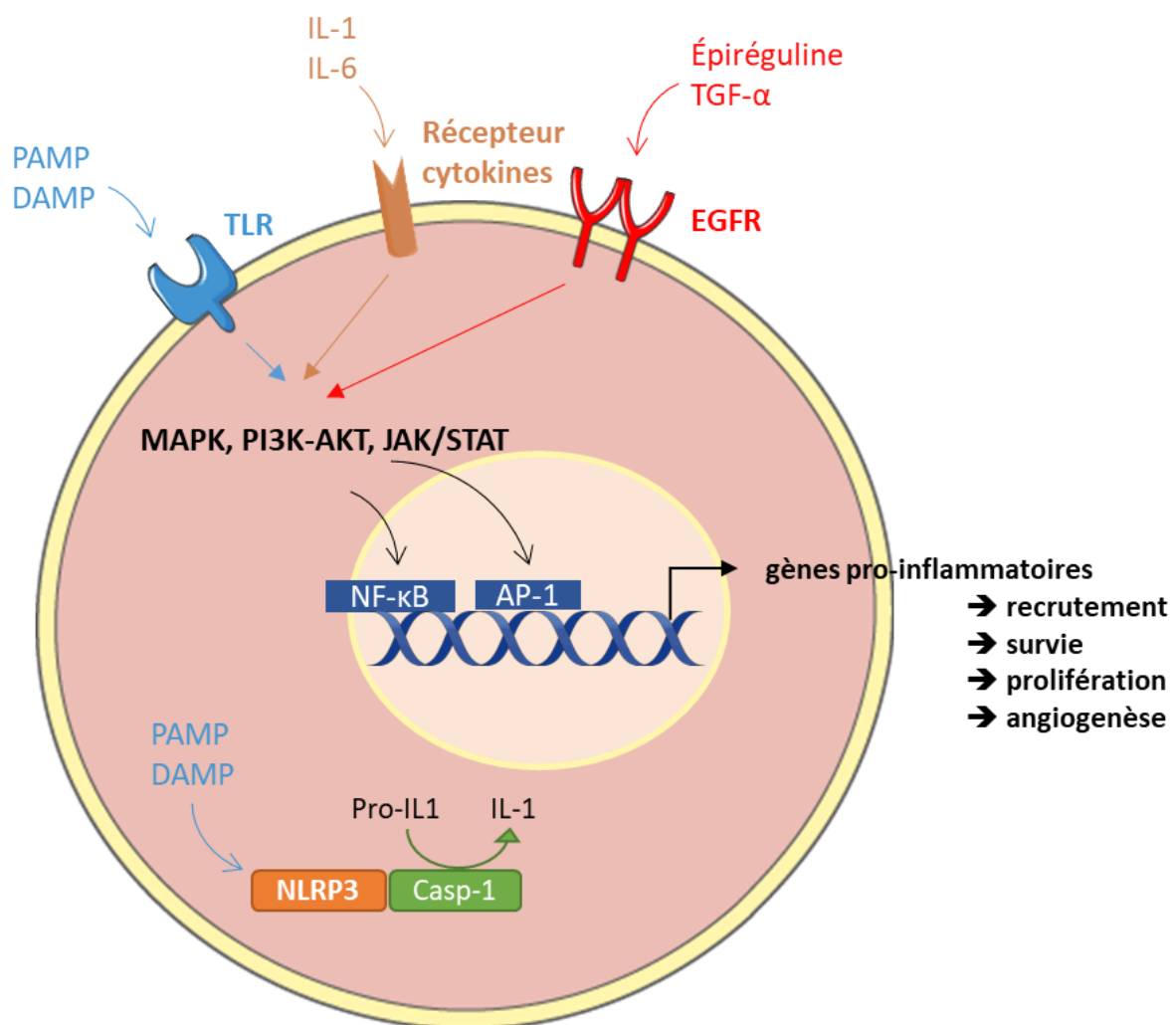


Figure 24 : Mécanismes conduisant à la sécrétion de cytokines par l'épithélium induite par les PM

L'activation des PRR de l'épithélium par les PM est un autre mécanisme à l'origine de l'activation de NF- κ B [40,181,195]. Au contact de la surface des PM avec

les cellules épithéliales, les endotoxines bactériennes adsorbées sur les particules (e.g. LipoPolySaccharide (LPS)), peuvent directement interagir avec les TLR et les NLR [181,194]. Le stress oxydant généré à la surface des PM par les HAP et les métaux est aussi à l'origine de l'activation des PRR, notamment du NLRP3, sensible au stress oxydant, qui joue un rôle important dans la sécrétion d'IL-1 β et le recrutement pulmonaire de neutrophiles [196]. Certains composés minéraux cristallins tel que le quartz ou l'amiante peuvent aussi lyser les membranes cellulaires et déclencher la réaction inflammatoire via un stress oxydant et le relargage de DAMP [181,194]. Outre leur structure et leur composition, la surface spécifique des particules joue un rôle important dans leur réactivité de surface. Une étude a montré qu'une exposition de cellules pulmonaires aux nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) induit un stress oxydant et une production d'IL-8 qui ne sont pas détectés avec une exposition à la même masse de particules fines de TiO₂ [180]. De manière similaire, l'exposition de rats avec des nanoparticules de TiO₂ engendre un recrutement de cellules inflammatoires dans la muqueuse respiratoire beaucoup plus important qu'une exposition aux particules fines de la même composition [9]. Une autre théorie implique la rupture des lysosomes comme une source de DAMP pouvant contribuer au maintien de l'inflammation dans le temps. Les particules inhalées sont rapidement recouvertes de surfactant pulmonaire, masquant leurs sites de réactivité de surface et de ce fait, leur toxicité. Toutefois, suite à leur phagocytose, les particules sont internalisées dans des lysosomes où leur couche protectrice est dissoute par l'environnement acide. Les particules non dégradées interagissent avec les membranes lysosomales, ce qui mène à leur rupture. Le relargage du contenu des lysosomes dans la cellule entraîne une réaction inflammatoire via l'activation des NLR et mène ultimement à la mort cellulaire, en libérant le contenu dans l'espace extracellulaire [181]. Ce phénomène pourrait expliquer l'altération de la phagocytose des macrophages entraînée par les PM. Enfin, les PM induisent également une réponse adaptative et peuvent potentialiser la réaction allergique. Plusieurs études *in vivo* et *in vivo* ont montré qu'une exposition combinée aux allergènes (e.g. acariens) et aux PM induisent une réponse allergique plus importante qu'une exposition aux allergènes seule [197–199]. Outre leur potentiel adjuvant dans la réaction allergique, les PM sont aussi une source d'antigènes pouvant activer les cellules dendritiques et stimuler les effecteurs de type th1 th2 et th17 [197,200–202]. De plus, l'IL-1, l'IL-33, le TSLP et le GM-CSF, connus pour être induits

par les PM, sont des promoteurs importants de cytokines Th2, notamment via l'activation des ILC2 [66,203].

4.2.3.3. Dysfonction mitochondriale

Les mitochondries sont des organites senseurs de dérèglements homéostasiques précoces (e.g. hypoxie, concentration calcique, stress oxydant) et sont impliquées dans la régulation de multiples voies de signalisations intracellulaires (cf. 3.3.1. Fonction mitochondriale et stress oxydant). De nombreuses études ont montré qu'une exposition aux particules atmosphériques pouvait induire une altération de la fonction mitochondriale marquée par une production accentuée d'EROM et une diminution du $\Delta\Psi_m$ dans divers types cellulaires [204–208]. Des dommages structuraux avec notamment une rupture des crêtes et le gonflement de certaines mitochondries ont été observés dans des macrophages sanguins [205], et des cellules épithéliales bronchiques exposées aux particules fines et ultrafines [209]. Dans cette étude, les dommages structuraux n'ont pas été observés avec une exposition à la fraction grossière (PM_{10-2.5}). Alors que cette fraction grossière était retrouvée dans de larges vacuoles cytoplasmiques, les particules ultrafines étaient fréquemment localisées dans les mitochondries. Certaines particules fines étaient retrouvées dans les mitochondries, toutefois les dégâts structuraux étaient moins importants qu'avec les particules ultrafines. Une étude pangéomique a identifié l'activation de gènes et de voies de signalisation mitochondriales dans le sang de personnes exposées aux PM indiquant une stimulation du métabolisme mitochondrial [210]. L'exposition aux PM_{2.5} a également été corrélée avec une hypométhylation de l'ADN mitochondrial. Des études épidémiologiques ont observé une augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial dans le sang de travailleurs de l'acier [211] et de travailleurs de l'asphalte [212]. L'ADN mitochondrial n'est pas protégé par les histones et a une capacité de réparation diminuée comparée à l'ADN nucléaire. Les auteurs ont proposé ce mécanisme comme une compensation par la cellule des dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial. Cependant, une autre étude épidémiologique a observé une diminution du nombre de copies d'ADN chez des travailleurs exposés de manière importante aux PM₁₀ [213]. La modulation de la fonction mitochondriale, et sa contribution aux effets sanitaires causés par les polluants atmosphériques est un sujet

d'étude d'intérêt croissant. Toutefois, la fonction mitochondriale est surtout étudiée dans le contexte du déclenchement de l'apoptose, ou en réponse à des doses importantes de PM induisant une diminution significative du $\Delta\Psi_m$ [204–208]. Peu d'études toxicologiques se sont intéressées aux mécanismes d'adaptation et de survie cellulaire qui surviennent avec une exposition à des doses sub-apoptotiques, plus représentatives de la réalité physiologique. Les particules ultrafines, plus facilement internalisées dans les cellules, pourraient interagir directement avec les mitochondries et largement contribuer à l'altération de leur fonction.

4.2.3.4. Génotoxicité

Une substance est dite génotoxique lorsqu'elle peut causer des dommages à la molécule d'ADN ou altérer l'information génétique via l'apparition de mutations. Plusieurs types d'effets génotoxiques peuvent être distingués. (1) Les effets aneugènes causant une anomalie du nombre de chromosomes (aneuploïdie), (2) les effets clastogènes responsables de cassures chromosomiques et (3) les effets mutagènes qui provoquent une modification de la séquence nucléotidique. Le potentiel génotoxique des PM est fortement lié à leur composition chimique. Certains métaux (e.g. As, Cd, Ni, Cr) et HAP (e.g. benzo[a]pyrène, dibenzo(a,h)anthracène) sont connus pour avoir des propriétés génotoxiques et sont classés cancérigènes par le CIRC [214,215]. En outre, la pollution de l'air extérieur est également classée à part entière comme cancérigène certain depuis 2013 [143]. Ces propriétés génotoxiques peuvent provenir d'une part du stress oxydant généré, responsable de lésions oxydatives de l'ADN, et d'autre part par une action directe de composés électrophiles sur la molécule d'ADN. Les HAP notamment, sont considérés comme des pro-cancérigènes : leur bio-activation métabolique conduit à la formation de diol-époxydes, de o-quinones et de cations radicaux pouvant tous réagir avec l'ADN pour former des adduits [216]. La formation d'adduits peut induire des discordances dans la réplication de l'ADN et/ou altérer la méthylation ou la liaison de facteurs de transcription sur des séquences promotrices. Ces phénomènes peuvent causer des mutations héréditaires et altérer l'expression génique. C'est pourquoi la génotoxicité est considérée comme une étape initiatrice de la cancérogénèse.

Il existe plusieurs tests utilisés en toxicologie, permettant de mettre en évidence des marqueurs d'altération de l'ADN. Parmi les plus utilisés, le test des comètes permet d'évaluer l'intégrité de la molécule d'ADN en mettant en évidence les lésions par une migration électrophorétique. Le test du micronoyau consiste à évaluer la fréquence de cellules binucléées, témoignant d'une aneuploïdie ou d'une clastogénicité. Les adduits à l'ADN peuvent être détectés via un dosage immunologique de la 8-OHdG. Le potentiel génotoxique des PM a notamment été démontré par diverses études épidémiologiques, mettant en évidence une augmentation de la fréquence d'aberrations chromosomiques et de lésions de l'ADN dans les leucocytes de personnes exposées au trafic routier [217]. Les études toxicologiques montrent également des effets génotoxiques entraînés par les PM. Une augmentation de la 8-OHdG a été observée dans les poumons et le foie de souris exposées à des PM_{2.5} [193]. Des lésions de l'ADN ont aussi été observées *in vitro* sur des lignées épithéliales bronchiques exposées aux PM_{2.5} [218], et sur des primocultures épithéliales exposées aux PM₄ [188].

4.2.3.5. *Modulations épigénétiques*

L'épigénétique étudie les mécanismes causant des modifications de l'expression des gènes sans changement de séquence de l'ADN. Ces modifications appelées « marques épigénétiques » sont transmissibles au cours des cycles de division cellulaire et réversibles. Les mécanismes épigénétiques régulent notamment l'expression des gènes durant le développement de l'organisme et induisent les différences phénotypiques entre les cellules des différents tissus, malgré leur code génétique identique. Les marques épigénétiques sont largement influencées par notre environnement et nos habitudes de vie. Ce phénomène peut être illustré par les études sur les jumeaux homozygotes. Alors que les marques épigénétiques (méthylation de l'ADN, acétylation des histones) sont identiques chez les jumeaux dans les trois premières années de vies, des différences notables sont observées à 50 ans, et sont corrélées à une différence dans l'expression des gènes [219]. De nombreuses études ont contribué à décrire les modifications épigénétiques induites par une exposition aux PM. Toutefois, leur implication dans les mécanismes pathologiques décrits ne sont pas encore bien compris. Les mécanismes épigénétiques régulent l'expression génique en

contrôlant la disponibilité d'une séquence codante de l'ADN. Ces modifications comprennent la méthylation de l'ADN, et le remodelage de la chromatine via la modification d'histones (e.g. méthylation, acétylation). L'expression des gènes peut aussi être régulée à un niveau post-transcriptionnel, notamment par les micro-ARN.

4.2.3.5.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN se produit par l'ajout d'un groupement méthyle sur des nucléotides, principalement des cytosines. Cette réaction est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT) et est associée à la répression de la transcription de la région méthylée. Une grande partie des sites méthylés se trouve sur des séquences répétées et transposables de l'ADN telle que Long-Interspersed Nuclear Element (LINE-1) et ALU. Aussi, le taux de méthylation de LINE-1 et ALU est hautement corrélé avec celui de l'ensemble du génome [220]. L'exposition aiguë et chronique aux PM a été associée avec une hypométhylation de ces séquences répétées [193,221–225]. L'hypométhylation de LINE-1 et ALU a aussi été associée avec le déclin de la fonction pulmonaire, et le vieillissement en général, bien qu'il n'y ait pas de lien de causalité établi [226]. Outre l'hypométhylation globale de l'ADN, l'exposition aux PM peut induire des changements spécifiques tels qu'une hyper méthylation du promoteur de gènes « suppresseurs de tumeur » comme *p16* [225,227] et *p53* [228], et une hypométhylation du promoteur de *NOS2A* codant pour la nitric oxide synthase (NOS), associée à l'augmentation de l'oxyde nitrique exhalé [223,229,230]. Une étude de cohorte a montré qu'une exposition de 28 jours à des concentrations modérées de polluants atmosphériques était associée à un déclin de la fonction respiratoire (CVF et VEMS chez des personnes âgées. La diminution de la fonction respiratoire était plus importante chez les participants ayant un taux de méthylation dans les lymphocytes plus bas sur le gène *TLR2*, et plus haut sur le gène anti-inflammatoire *GCR*, codant pour le récepteur des glucocorticoïdes [231]. Selon les auteurs, les marques épigénétiques pourraient également potentialiser la susceptibilité des individus à la pollution atmosphérique.

4.2.3.5.2. Modification des histones

Les histones sont les principaux constituants protéiques des chromosomes. Ils servent de points d'ancrage pour l'enroulement et la condensation de la molécule d'ADN. L'affinité de l'ADN avec les histones est responsable de l'organisation de la chromatine. Elle peut être modulé par différents types de modifications (e.g. méthylation, acétylation des histones), rendant plus ou moins accessibles certaines régions codantes pour leur transcription. La modification la plus décrite est l'acétylation des histones, régulée par les histone acétylases (HAT) et les histone désacétylases (HDAC). L'ajout d'un groupement acétyle sur une lysine (K) d'un histone (H) par les HAT est généralement associé à la libération d'une région de l'ADN et l'augmentation de sa transcription. A l'inverse, l'activité HDAC contribue à diminuer la transcription. Par ce mécanisme, les HAT/HDAC peuvent réguler l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoire, notamment via l'expression de NF- κ B. Dans des biopsies bronchiques de personnes asthmatiques et atteintes de BPCO, le ratio HAT/HDAC est plus important que chez les personnes saine [75,232]. Les études ont également montré une corrélation entre la perte d'activité HDAC et la sévérité de l'inflammation bronchique couplée à une acétylation plus importante de l'histone H4 dans la BPCO [233]. Ainsi, la dérégulation de la balance HAT/HDAC en faveur d'une activité acétylase augmentée pourrait contribuer à maintenir la transcription de gènes pro-inflammatoires médiée par NF- κ B, et participer au processus inflammatoire mis en jeu dans les BPC. Différentes modifications induites par les PM ont été décrites sur des modèles toxicologiques et par des études épidémiologiques. La dérégulation du ratio HAT/HDAC dans les tissus pulmonaires a été observée in vitro et in vivo après une exposition aux PM_{2.5}. Les résultats montrent une diminution de l'activité HDAC couplée à une augmentation de l'activité HAT [225,234]. Des études ont aussi montré un lien entre exposition aux PM et acétylation de l'histone H3 en K9 (H3K9ac) [225,235,236], et en K27 (H3K27ac) [225,234], des modifications connues pour réguler la prolifération cellulaire et l'activation des cellules immunitaires [234,236,237]. Une augmentation de l'acétylation de H4 a aussi été décrite et associée à l'induction de l'IL-8 et de la cyclooxygénase 2 (COX-2) [238,239].

Les études toxicologiques menées principalement depuis les années 1990, ont permis de conforter les observations faites par les études épidémiologiques sur l'induction et l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire provoquées par une exposition aux PM, et d'identifier certains mécanismes en cause. Le stress oxydant généré par la structure/composition des PM et de manière endogène par un stress mitochondrial est impliqué dans de nombreux processus pathologiques décrits. Il contribue à l'initiation et au maintien de la réaction inflammatoire en activant des voies de signalisations moléculaires sensibles à l'état redox, et est potentiellement responsable d'effets génotoxiques. L'inflammation des voies respiratoires est entretenue par des modulations épigénétiques caractéristiques telle que l'acétylation d'histones au niveau de gènes pro-inflammatoires et l'hypo méthylation des séquences répétées de l'ADN, couplée à l'hyper méthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeur et antiinflammatoires. Dans le contexte d'une exposition répétée à la pollution atmosphérique, le trio stress oxydant / inflammation / modulations épigénétiques pourrait progressivement induire un remodelage et/ou une hyperréactivité bronchique, caractéristiques des pathologies pulmonaires chroniques à composante inflammatoire (Figure 25). Malgré certains mécanismes assez bien décrits *in vitro* et *in vivo* sur la toxicité des PM₁₀ et des PM_{2.5}, les études qui s'intéressent à la fraction ultrafine, montrées comme plus réactives sont récentes et peu nombreuses du fait de la complexité de leur échantillonnage. De plus, les mécanismes menant à l'initiation et l'exacerbation des BPC sont encore peu connus.

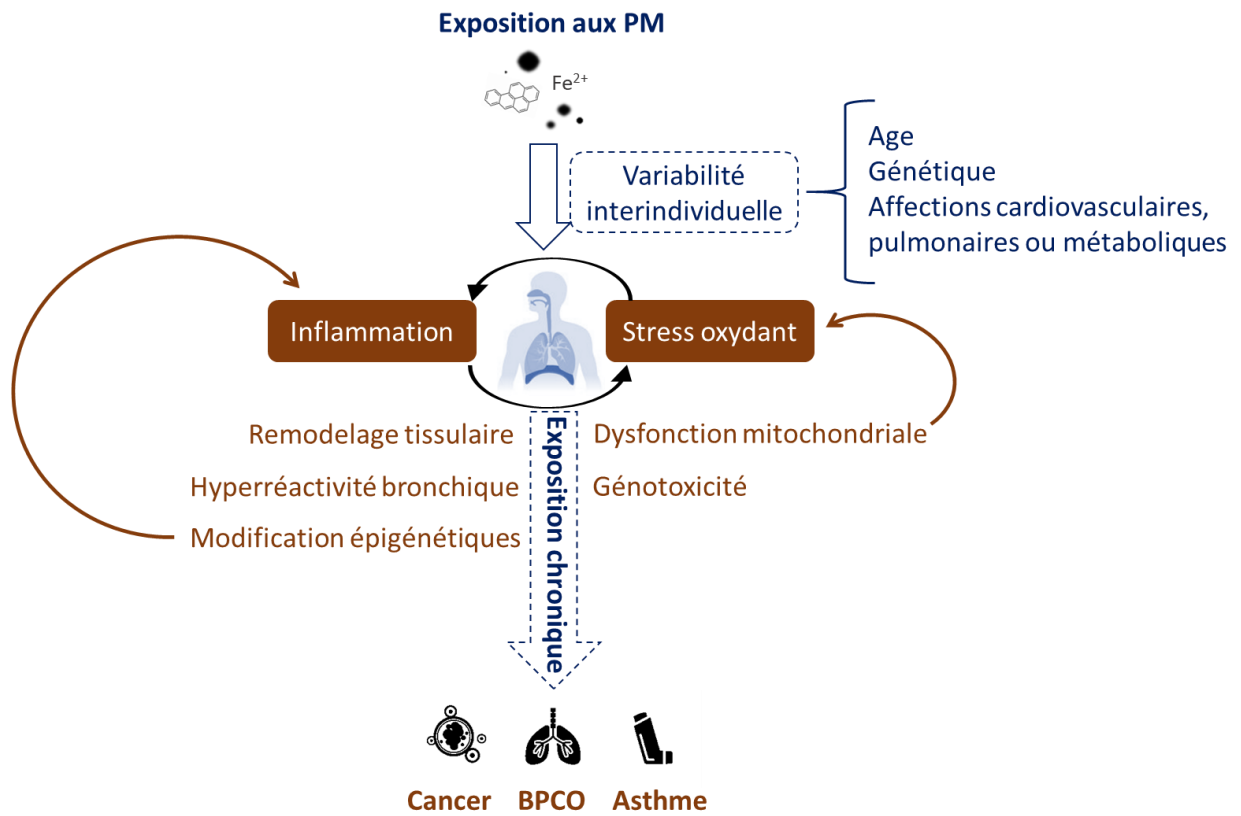


Figure 25 : Principaux mécanismes décrits dans la toxicité des PM, associés avec la pathogenèse des bronchopneumopathies chroniques

Problématique et objectifs du projet de thèse

Les teneurs en PM dépassent encore régulièrement les limites de qualité fixées par les directives européennes dans de nombreuses villes. La toxicité respiratoire de ces polluants a été largement démontrée ces dernières décennies. A ce jour, bien que le rôle des polluants atmosphériques dans l'incidence et l'aggravation de l'asthme et la BPCO soit avéré, les mécanismes d'initiation et de maintien de l'inflammation bronchique sont encore peu connus. L'impact sanitaire réel de niveaux modérés de pollution atmosphérique ainsi que la contribution respective de chaque polluant restent difficiles à évaluer précisément par les approches épidémiologiques. Ces études se heurtent en particulier à la difficulté de mesurer l'exposition précise à l'échelon individuel sur le long terme, à la prise en compte des parts relatives des atmosphères intérieures et extérieures, et à la complexité physico-chimique de la pollution atmosphérique. Des approches en toxicologie, utilisant des modèles *in vitro* plus représentatifs de la physiologie humaine, sont donc nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets délétères de la pollution atmosphérique. L'épithélium bronchique constitue la première ligne de défense contre les agressions des voies respiratoires. Ses jonctions serrées lui confèrent un rôle de barrière physique, tandis que l'ascenseur mucociliaire contribue à évacuer les matières piégées dans le mucus. Les cellules épithéliales jouent aussi un rôle clef dans l'initiation et l'orchestration de la réaction inflammatoire via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, interleukines et médiateurs lipidiques). Alors que les études sur la toxicité des particules fines (PM_{2.5}) sont nombreuses, peu d'études se sont intéressées à la fraction ultrafine (PM_{0.1}) de la pollution atmosphérique. Cette fraction, très importante en nombre de particules et présentant une surface spécifique très élevée, pourrait majoritairement contribuer aux effets délétères de la pollution atmosphérique particulaire.

Le premier objectif de ce travail consistait à évaluer, à l'aide de modèles de cellules épithéliales bronchiques humaines différenciées à l'interface air liquide, l'effet d'une exposition aiguë ou répétée à des faibles doses de PM_{2.5-0.18} (PF) ou de PM_{0.18} (PUF) sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, les profils d'expression transcriptomiques (ARNm), les modulations épigénétiques et la génotoxicité, en

intégrant la sensibilité particulière des individus atteints d'asthme ou de BPCO (Figure 26).

De récentes publications de même que certains de nos travaux suggèrent d'une part que la mitochondrie est une cible critique des $PM_{2.5}$, et d'autre part, que les dysfonctions mitochondriales pourraient être impliquées dans la pathogenèse des BPC. Dans ce contexte, dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à l'étude de la dynamique et de la fonction mitochondriale en réponse à l'exposition aux PF et aux PUF, sur la lignée épithéliale bronchique humaine BEAS-2B (Figure 26).

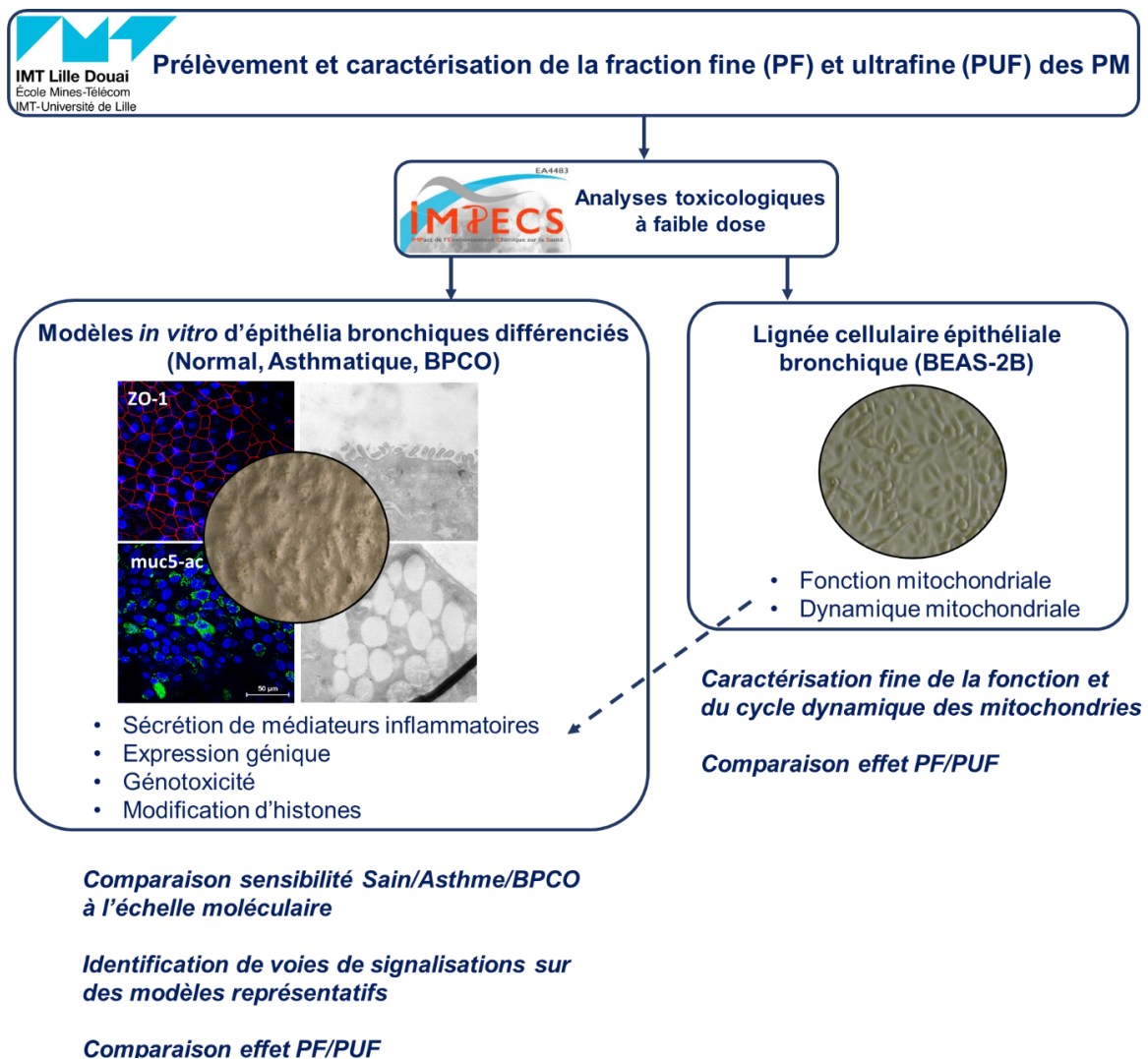


Figure 26 : Objectifs du projet de thèse

Matériels et méthodes

Ce projet de thèse a été abordé de manière pluridisciplinaire en associant la caractérisation physicochimique des particules atmosphériques (PM) aux études toxicologiques *in vitro*. Ce travail a fait l'objet de collaborations avec les chercheurs du département Science de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE) de l'Institut Mines Télécom Lille Douai (IMT Lille Douai) et l'équipe Métaux et Céramiques à Microstructures Contrôlées (MCMC) de l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est (ICMPE, UMR 7182) pour le prélèvement et la caractérisation physicochimique des polluants. Les résultats liés à la caractérisation physico-chimique des particules sont présentés dans la première partie. Les deux autres parties seront consacrées respectivement aux études sur cellules primaires et sur lignée cellulaire comme présenté dans les objectifs.

Des cellules épithéliales bronchiques humaines différenciées à l'interface air liquide ont permis d'obtenir un modèle d'épithélium cilié et sécrétoire *in vitro*, caractérisé par un marquage fluorescent de protéines caractéristiques de l'épithélium respiratoire différencié. Ces modèles ont été utilisés pour réaliser les analyses toxicologiques exploratoires sur des cellules bronchiques issues de 4 personnes saines, 4 patients asthmatiques, et 4 patients atteints de BPCO. Après exposition aiguë ou répétée à une faible dose de particules fines (PF) ou ultrafines (PUF), le milieu de culture a été récupéré pour analyser la sécrétion de cytokines et la libération de glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Les cellules ont été lysées pour (1) mesurer la concentration d'ATP intracellulaire, (2) extraire l'ARN et analyser l'expression des gènes par microarray, (3) analyser l'acétylation des histones et l'activité enzymatique des histones acétyltransférases (HAT) et des histones désacétylases (HDAC).

Des lignées cellulaires provenant d'un épithélium bronchique humain non cancéreux (BEAS-2B) ont été utilisées pour caractériser plus finement la fonction et la dynamique mitochondriale en réponse à une dose sub-apoptotique de particules. Après exposition aiguë ou répétée des cellules aux PF ou aux PUF, nous avons analysé (1) l'induction de l'apoptose, (2) la concentration d'ATP intracellulaire, (3) le potentiel de membrane mitochondrial, (4) la respiration mitochondriale (5) la

production d'anion superoxyde (O_2^-). Les modifications au niveau du cycle dynamique des mitochondries ont été analysées en quantifiant l'expression de marqueurs de masse mitochondriale et de protéines impliquées dans la fusion et la fission.

1. Prélèvement et échantillonnage des particules

La zone de prélèvement est située sur le littoral Dunkerquois, dans la commune de Grande-Synthe (59). Ce site a la spécificité d'être influencé par les émissions atmosphériques de particules industrialo-portuaire, urbaines et routières (Figure 27).



Figure 27 : Situation géographique du site de prélèvement (géoportail.gouv.fr)

L'espace urbain qui comprend le site de prélèvement est entouré par une zone d'activité contenant des usines sidérurgiques, une usine métallurgique, une usine pétrochimique et deux raffineries de pétrole. Le site se trouve à proximité des autoroutes A16 et A25, et à 4 km de la mer du Nord. La direction des vents dominants NE-SO, issue des phénomènes de brise de mer déplace les masses d'air humides et salines provenant de la mer et peut également influencer la composition chimique des particules.

Le prélèvement des PM a fait l'objet d'une collaboration avec les chercheurs du département Science de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE) de l'Institut Mines Télécom Lille Douai (IMT Lille Douai). Les PM ont été collectées selon le principe d'impaction en cascade (Figure 28). Un préleveur haut-débit « High Volume Impactor Sampler » (400 L/min) [240] a été utilisé pour collecter par impaction la fraction fine, comprise entre 2,5 μm et 0,18 μm , et, par filtration, la fraction dite « quasi-ultrafine » ($< 0,18 \mu\text{m}$), collectée sur des filtres de format A4 en polycarbonate.

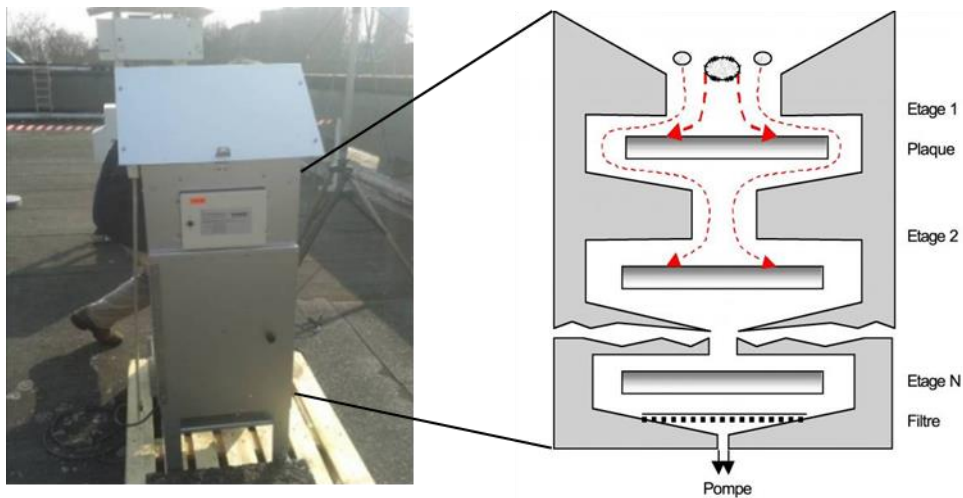


Figure 28 : Principe d'un impacteur en cascade, modifié d'après Renoux et Bouleau [241]

Les échantillons, correspondant à 7 jours de prélèvement chacun, ont été collectés entre le 9 septembre 2013 et le 14 avril 2014, stockés à -20°C , puis combinés, afin d'obtenir un cumul suffisant pour permettre la caractérisation physico-chimique, et les analyses toxicologiques. Les échantillons de particules fines (PF) (2,5-0,18 μm) collectés directement sur les plaques d'impaction téflonnées ont été transférés à l'aide d'une spatule en Téflon dans un flacon propre. Les PF ont ensuite été pesées avec une balance de précision puis diluées dans une solution saline (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)) à 2,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, afin de pouvoir exposer les cultures cellulaires. Les échantillons de particules ultrafines (PUF) ($< 0,18 \mu\text{m}$) collectés sur filtres grand format ont été directement extraits aux ultrasons dans de l'HBSS à une concentration de 2,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Toutes les manipulations ont été effectuées dans une salle blanche et le matériel a été préalablement décontaminé à l'acide ou à l'alcool. Les PUF représentent 10,5% de la masse totale des particules collectées

(PM_{2.5}). Ce pourcentage est légèrement plus élevé que les valeurs habituelles (i.e. < 5%). Cette observation peut être due à l'inclusion de particules plus larges que les PUF typiques (PM_{0.1}) dans les PM_{0.18} et à la localisation du site de prélèvement à proximité de grandes voies de circulation et de complexes industriels.

2. Caractérisation physico-chimique des particules

2.1. Distribution granulométrique et potentiel zêta

La concentration des solutions de particules (PF et PUF) dans l'HBSS a été ajustée à 1 µg/µl pour confirmer la granulométrie des deux fractions par granulométrie laser. Le principe de cette technique est basé sur la diffusion dynamique de la lumière par le mouvement brownien des particules. L'équation de Stokes-Einstein établit la relation entre le mouvement brownien et la taille. Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien est important. En prenant deux mesures sur un intervalle de temps infime (environ 100 µs), la lumière diffusée permet d'analyser l'intensité du mouvement et d'en déduire la taille des particules. Les échantillons ont été soumis aux ultrasons pendant 2 min afin de limiter toute agglomération des particules, puis analysés avec le Zetasizer nano ZS (Malvern©, Worcestershire, Angleterre).

Ce dernier permet également d'analyser le potentiel zêta qui représente la charge surfacique acquise par la particule quand elle est en suspension. Lorsque leur charge est importante (négative ou positive), les particules ont tendance à se repousser entre elles et s'agglomèrent peu. Les particules sont considérées comme stables en suspension quand leur potentiel zêta est inférieur à -30 mV, ou supérieur à +30 mV. Le potentiel zêta est analysé suivant le principe d'une électrophorèse. Deux électrodes, une anode et une cathode, placées aux extrémités de l'appareil permettent de donner une seconde dimension au mouvement des particules dans la solution. En plus d'être soumises au mouvement brownien, les particules migrent vers les électrodes selon un gradient électrochimique. Les données de distribution granulométrique et de potentiel zêta présentées dans les résultats sont une moyenne de 13 scans successifs réalisés à température ambiante (25°C).

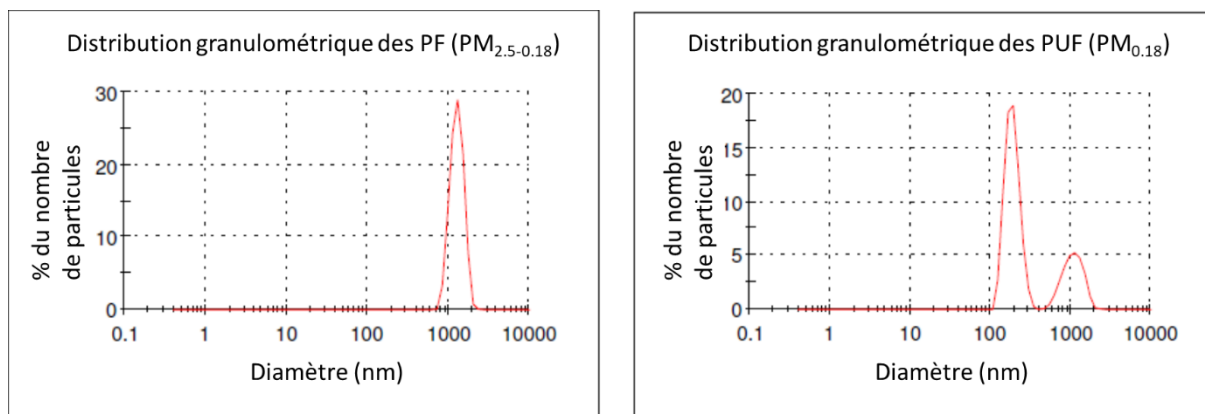


Figure 29 : Distribution granulométrique des PF et des PUF

La distribution de la taille des PF apparaît en un pic de moyenne 1265 +/- 238,8 nm. La distribution de la taille des PUF fait apparaître deux pics, l'un de moyenne 188 +/- 39,86 nm correspondant aux PUF et l'autre de moyenne 1078 +/- 304,5 nm pouvant correspondre à des agrégats de PUF (Figure 29), ces dernières ayant davantage tendance à s'agréger. Le potentiel zêta moyen des échantillons de PF est de - 12,4 mV, celui des PUF est de -17,3 mV.

2.2. Analyse élémentaire par spectrométrie photoélectronique X

L'analyse élémentaire surfacique a fait l'objet d'une collaboration avec l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est (ICMPE-CNRS, UMR 7182). La spectrométrie photoélectronique X (XPS) est une technique permettant d'ioniser les atomes présents à la surface d'un échantillon par une source de rayon X. Le niveau d'énergie des électrons libérés étant propre à chaque élément, le spectre des photoélectrons libérés permet de déduire la composition élémentaire de l'échantillon analysé. Seuls les éléments concentrés à > 0,1% sont détectés avec cette technique. Une source Mg K α monochromatée avec un spot de 50 μm a été utilisée pour générer les rayons X. Les échantillons ont été déposés sur un wafer de silicium (Figure 30) et introduits dans un vide secondaire de l'ordre de 10^{-7} mbar avant d'être transférés dans la chambre d'analyse à 10^{-9} mbar. Le temps de séjour dans la chambre d'introduction est de l'ordre de 60 min pour obtenir un dégazage correct des échantillons. Le temps de séjour dans la chambre d'analyse est de l'ordre de 320 min (durée de l'analyse pour tous les échantillons).

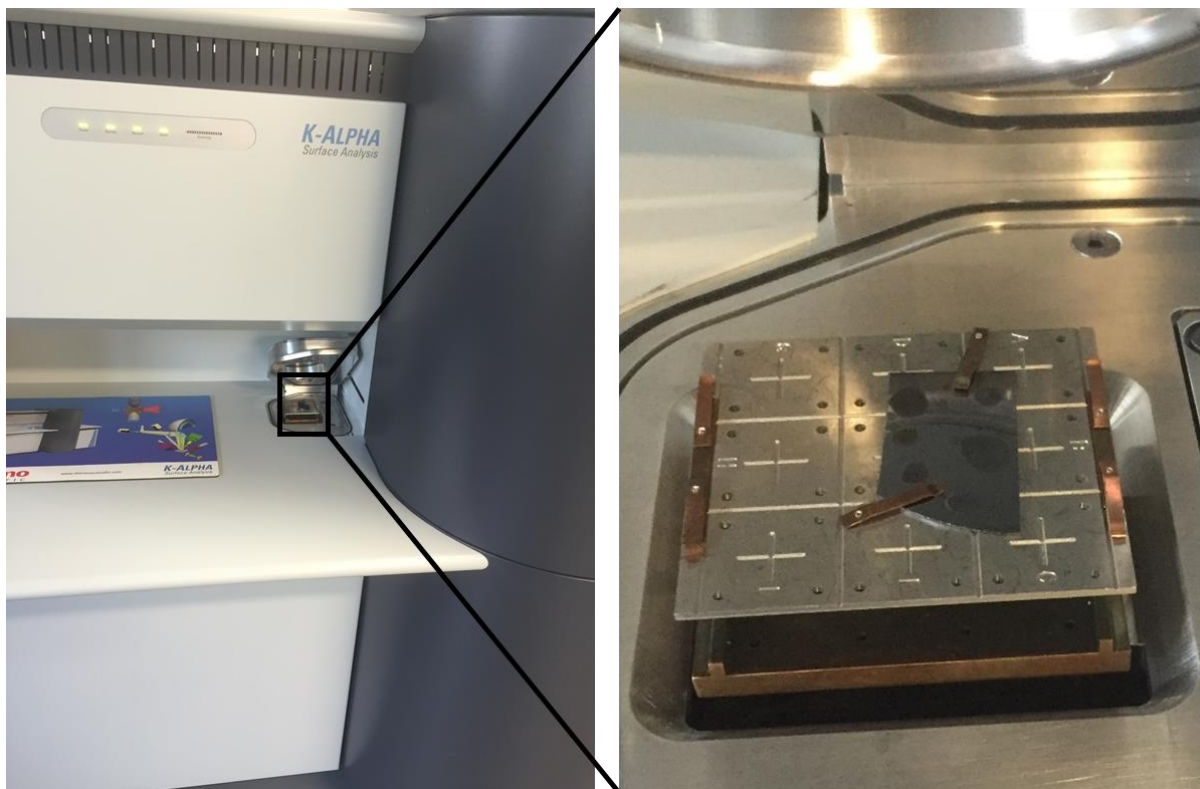


Figure 30 : appareil XPS. Les solutions de PF et de PUF ont été déposées en triplicata sur un wafer en silicium, puis séchés avant d'être introduits dans l'appareil.

Pour chaque échantillon, un spectre XPS global (survey) a été réalisé. Il permet de mettre en évidence les niveaux de cœur des atomes émetteurs dont l'énergie de liaison est inférieure à 1254 eV (résolution de 1.0 eV). Ensuite des spectres à plus haute résolution (résolution de 0.05 eV) ont été réalisés sur les niveaux de cœur des éléments détectés. La durée d'exposition aux rayons X pour chaque échantillon est de l'ordre de 600 s. Les échantillons de PF et de PUF ont chacun été analysés en triplicata.

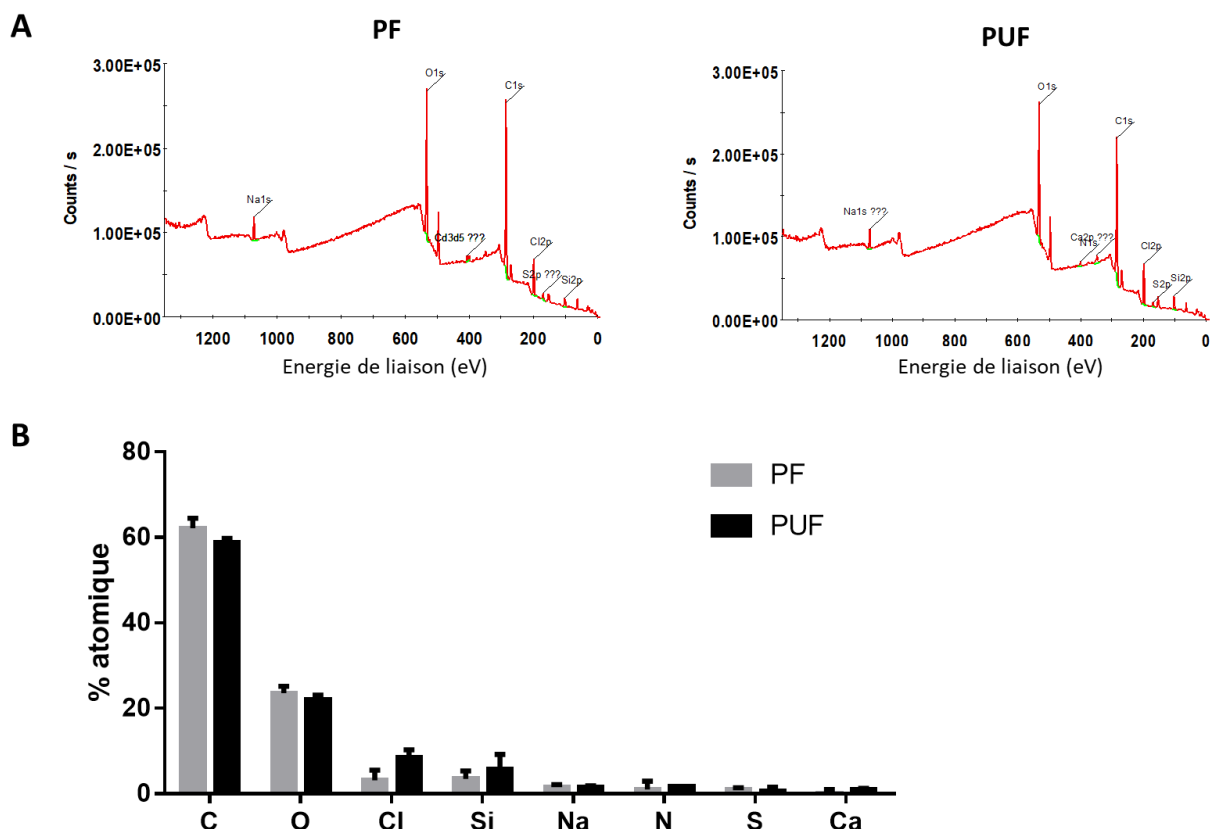


Figure 31 : Composition élémentaire en surface des particules (A) spectres XPS, (B) Pourcentage des principaux éléments surfaciques.

Les deux types de particules analysées présentent des spectres XPS similaires qui révèlent une absence de fer ou d'élément métalliques > 0,1%). Les particules sont majoritairement composées de C, O avec des pourcentages plus faibles de N, Na, Ca, Si, Cl et S (Figure 31).

2.3. Analyse des métaux et métalloïdes par spectrométrie de masse

L'analyse quantitative des éléments traces a fait l'objet d'une collaboration avec le département SAGE de l'IMT Lille-Douai. L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) est une technique de haute résolution permettant de détecter et quantifier des éléments présents à l'état de trace (< 1 µg/g (0,1%)) dans un échantillon. Les échantillons ont d'abord été minéralisés en milieu acide (HNO₃/H₂O₂/HF), pour détacher les atomes de leur socle organique, puis vaporisés dans l'appareil pour être ionisés par une torche à plasma. Les ions obtenus sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), spécifique à chaque élément, par un champ

magnétique, puis détectés par un compteur de particules. Les éléments Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Ti, V, Zn ont été analysés par ICP-MS dans les deux types d'échantillons (PF et PUF) en triplicata. L'analyse a été réalisé avec le NeXion 300x (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), la méthode analytique a été détaillée par Mbengue et al. [242].

Tableau 4 : Concentrations en éléments traces analysées par ICP-MS (# éléments non considérés du fait de leur présence en quantité non négligeable dans l'HBSS)

Element (µg/g)	PF	PUF
As	23.0	64.8
Ba	140.3	64.4
Be	0.4	0.3
Cd	16.9	19.3
Ce	8.5	6.3
Co	5.4	9.3
Cs	4.4	8.9
Cu	367.0	425.2
La	8.4	3.1
Mn	1350.4	582.2
Mo	25.6	36.7
Ni	98.7	199.7
Pb	399.4	541.9
Rb	26.3	44.1
Sb	47.1	49.3
Sn	49.6	111.1
Sr	91.8	49.3
Ti	3.0	5.7
Zn	4000.2	2460.7
Cr	97.3	120.7
V	75.0	196.3
Al	5252.2	3621.1
Ca	17,904.5	11,857.4
Fe	16,406.1	10,267.0
K	1240.3	#
Mg	6591.3	#
Na	43,510.8	#
Si	9383.5	7568.1

L'analyse par ICP-MS montre des différences plus accentuées entre les PF et les PUF sur la concentration en certains éléments traces (e.g. As, Mn, Ca). D'après les

chercheurs de l'IMT, les teneurs en Mn, Zn, As, Ni, Pb et V sont particulièrement élevées (Tableau 4) par rapport à ce qui est habituellement mesuré dans la région, soulignant le caractère industriel marqué de la zone de prélèvement.

2.4. Analyse des HAP par chromatographie liquide à haute performance

L'analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) a fait l'objet d'une collaboration avec le département SAGE de L'IMT Lille-Douai. La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) est une technique de séparation à haut débit permettant d'isoler des molécules en fonction de leur temps de rétention dans une colonne de chromatographie. Le signal est ensuite analysé par un détecteur. L'extraction liquide des HAP a été réalisée dans l'acétonitrile avec le Dionex ASE 200 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). L'extrait a ensuite été enrichi par évaporation à 60°C, puis analysé par HPLC. L'HPLC est constituée d'un module de séparation (colonne) Waters 2695 Alliance system (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) couplé à un détecteur 996-photodiode array et un détecteur de fluorescence 2475. Cette méthode a été utilisée pour la quantification de 18 HAP (Tableau 5) : Fluoranthène, Pyrène, Benzo(c)phenanthrène, Benzo(a)anthracène, Chrysène, 5-Methylchrysène, Benzo(e)pyrène, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(j)fluoranthène, Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)pyrène, Dibenzo(a,l)pyrène, Dibenzo(a,h)anthracène, Benzo(g,h,i)perylène, Indeno(1,2,3-c,d)pyrène, Dibenzo(a,e)pyrène, Anthanthrène et Coronène. Les analyses ont été réalisées en triplicata et la méthode analytique a été détaillée par Crenn et al. [243].

Tableau 5 : Concentrations en HAP Analysées par HPLC

HAP ($\mu\text{g/g}$)	PF	PUF
FLA	5.1	4.3
PYR	4.2	3.7
BcPHE	0.4	0.2
BaA	6.9	4.2
CHR	6.8	2.8
5MCHR	1.1	3.4
BeP	9.9	0.8
BbF	7.6	8.0
BjF	4.7	9.9
BkF	7.4	4.6
BaP	3.8	5.3
DalP	0.8	0.4
DahA	2.6	1.5
BehiP	12.0	12.5
IP	14.0	12.1
DaeP	3.6	2.7
ANTH	0.1	3.3
COR	2.9	4.5

Les concentrations en HAP étaient quasi similaires entre les deux types de particules. Toutefois, une légère augmentation de la concentration totale en HAP (10%) a été observée dans les PF. Dans les PF et les PUF, les concentrations totales étaient respectivement de 94 $\mu\text{g/g}$ et de 84 $\mu\text{g/g}$. La concentration du benzo[a]pyrène, un traceur régulièrement étudié et cancérigène avéré était de 3,8 $\mu\text{g/g}$ dans les PF et de 5,3 $\mu\text{g/g}$ dans les PUF.

3. Etude des mécanismes de toxicité sur cellules primaires

3.1. Culture primaire et caractérisation de la différenciation cellulaire

3.1.1. Culture

Les modèles utilisés pour le dosage des médiateurs inflammatoires, l'analyse pangénomique, et des modifications d'histones sont des cellules primaires commerciales (Lonza, Bale, Suisse), provenant d'épithélias bronchiques humains de 4

patients sains (Normal Human Bronchial Epithelial Cell (NHBE)), 4 patients asthmatiques (Diseased Human Bronchial Epithelial Cell (DHBE-asthma)) et 4 patients atteints de BPCO (DHBE-COPD). Les caractéristiques des cellules obtenues auprès de la société Lonza sont indiquées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques des cellules et des patients, d'après les données fournies par Lonza

Variable	Patients sains	Patients asthmatiques	Patients BPCO
Nombre (n)	4	4	4
Age (années)	45.6 ± 26.2	58.8 ± 6.9	61 ± 15.0
Sexe	3 femmes / 1 homme	3 femmes / 1 homme	3 femmes / 1 homme
Ethnie	4 caucasiens	1 hispanique / 3 caucasiens	4 caucasiens
Tabagisme	4 non fumeurs	4 non fumeurs	4 fumeurs
Alcool	4 non consommateurs	4 non consommateurs	4 non consommateurs
Viabilité cellulaire (%)	84.3 ± 3.6	83.5 ± 2.9	79.3 ± 4.3
Comptage cellulaire (10 ³ /ampoule)	844 ± 73.7	972 ± 248.3	1355 ± 520.0
Efficacité d'ensemencement (%)	58.25 ± 27.4	62 ± 26.3	47.8 ± 16.5
Temps de doublement (h)	24.5 ± 6.0	25.8 ± 9.3	27.5 ± 5.7

Les cellules ont d'abord été cultivées dans des flasques T75 CellBind (Corning®, New York, USA), avec un milieu de culture synthétique défini LHC-9 (Thermo Fisher Scientific). Cette première phase de culture en flasque a permis d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour les analyses prévues. Les cellules ont ensuite été transférées dans des inserts à membrane poreuse (BD Falcon™ Cell Culture inserts for Companion TC plate, 0,4 µm PET, 4,2 cm²) à 200 000 cellules par insert. Pour la phase de multiplication en insert, le milieu de culture B-ALI™ growth medium (Lonza) a été utilisé dans le puits (1 ml) et dans l'insert (1,5 ml). Après confluence totale dans l'insert, les cellules ont été passées à l'Interface Air-Liquide (IAL) pour initier la phase de différenciation. Le milieu B-ALI™ différenciation medium (Lonza) a été disposé dans l'insert (1,5 ml) et changé tous les deux jours pendant 28 jours. Tous les milieux de culture utilisés ont été complétés par un antibiotique à large spectre (pénicilline/streptomycine) à 1% v/v, et un antifongique (amphotéricine-B) à 1% v/v. L'entretien des cultures a été réalisé en suivant les recommandations du fournisseur.

3.1.2. Observation en microscopie électronique

Suite à leur différenciation à l'IAL, les modèles d'épithélia *in vitro* ont été observés en coupe par microscopie électronique en transmission (MET). Pour se faire, les cellules ont d'abord été fixées dans une solution de paraformaldéhyde-glutaraldéhyde (2% v/v dans du PBS) pendant 20 min, puis 40 min en renouvelant la solution de fixation. Après une post-fixation au tétroxyde d'osmium (1% v/v dans du PBS), les cellules ont été progressivement déshydratées dans l'éthanol, incluses dans un mélange de résine Epon/éthanol, puis dans l'Epon. Après polymérisation totale de la résine, des sections de 85 nm ont été coupées, marquées à l'acétate d'uranyle (2% v/v) et au citrate de plomb de Reynold, pour être observées sur le MET Zeiss EM900 (Carl Zeiss SAS, Marly le Roi, France).

3.1.3. Marquages immuno-fluorescents

Des marquages fluorescents ont également été réalisés pour confirmer le phénotype épithélial et la différenciation cellulaire. Les cellules ont été fixées dans leur insert par une incubation dans du paraformaldéhyde (1% v/v) pendant 3 min, puis dans du méthanol pendant 5 min à -20°C. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées par une incubation dans du Triton X-100 (0,2% v/v dans du PBS), rincées trois fois au PBS pendant 5 min, puis incubées avec les anticorps primaires dilués dans une solution à 3% d'albumine de sérum bovin, 0,05% de Tween® 20 et 0,08% d'azide de sodium (NaN₃) (v/v dans du PBS) à la concentration recommandée par les fournisseurs (Merck, Darmstadt, Allemagne) durant 12h à 4°C. Les anticorps primaires utilisés étaient le monoclonal anti-human pan cytokeratin (clone PU5, dilution 1/100^{ème}), le mouse monoclonal anti-human mucin-5ac (clone CLH2, dilution 1/200^{ème}), et le rabbit polyclonal anti-human zonula occludens-1 (ZO-1; clone 5G6.1, dilution 1/100^{ème}). Le lendemain, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires : goat polyclonal anti-mouse antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate et goat polyclonal anti-rabbit antibody, Alexa Fluor® 568 (ThermoFisher Scientific). Les anticorps secondaires ont été dilués dans le même tampon que les anticorps primaires au 1/400^{ème}. Enfin, les inserts ont été découpés et montés entre lames et lamelles avec le DAPI SlowFade® Gold Antifade (Life Technologies). Les images ont été acquises

sur le microscope confocal LSM 710 (Zeiss), à la plateforme d'imagerie cellulaire de l'université de Lille BICEL-IFR114.

3.2. Exposition des modèles cellulaires aux particules

Pour définir une dose d'exposition sub-létale, un test de cytotoxicité basé sur le contenu intracellulaire en ATP (cf. 5.1.1. Cytotoxicité) a préalablement été réalisé après exposition des NHBE différenciées à l'IAL. La dose retenue de $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de tapis cellulaire correspond à la Dose Létale (DL) pour approximativement 10 % des cellules (DL_{10}).

Pour réaliser les expositions des cellules primaires, les particules ont été diluées dans l'HBSS complété avec 1% v/v d'amphotéricine-B à 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Une dose de $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ correspond à 500 μl d'une solution de 46,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ par insert. La solution est appliquée goutte à goutte sur le pôle apical des cellules, puis retirée après 6 h d'exposition. Les cellules ont été exposées à l'HBSS, aux PF ou aux PUF, de manière aiguë ou répétée. Pour se faire, chaque lot de cellules a été divisé en 5 groupes : (1) le groupe contrôle exposé à l'HBSS complété à 1% v/v d'amphotéricine-B, (2) le groupe exposé aux PF une fois durant 6 h, (3) le groupe exposé aux PF trois fois durant 6 h, avec 18 h d'espacement entre les expositions, et de manière similaire, (4) le groupe exposé aux PUF une fois durant 6 h et (5) le groupe exposé aux PUF trois fois durant 6 h, avec 18 h d'espacement entre les expositions (Figure 32).

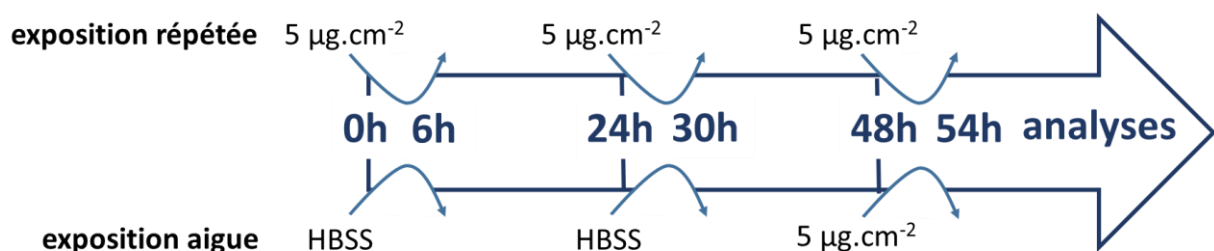


Figure 32 : Méthodologie d'exposition des cellules primaires en IAL aux particules (PF ou PUF) ; une exposition dure 6h. Les cellules du groupe « exposition aiguë » sont exposées à la solution témoin (HBSS) les deux premiers jours. Les cellules du groupe contrôle sont exposées à la solution témoin durant les 3 jours.

Immédiatement après la dernière période de recouvrement, les milieux de culture ont été collectés et congelés à -80°C , et les cellules ont été lavées avec un tampon salin (Phosphate-Buffered Saline, PBS), puis congelées à sec à -80°C dans l'attente des analyses toxicologiques. Pour l'analyse pangénomique, les cellules ont été récupérées dans le tampon du kit AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France), puis congelés à -80°C dans l'attente de l'extraction des ARN.

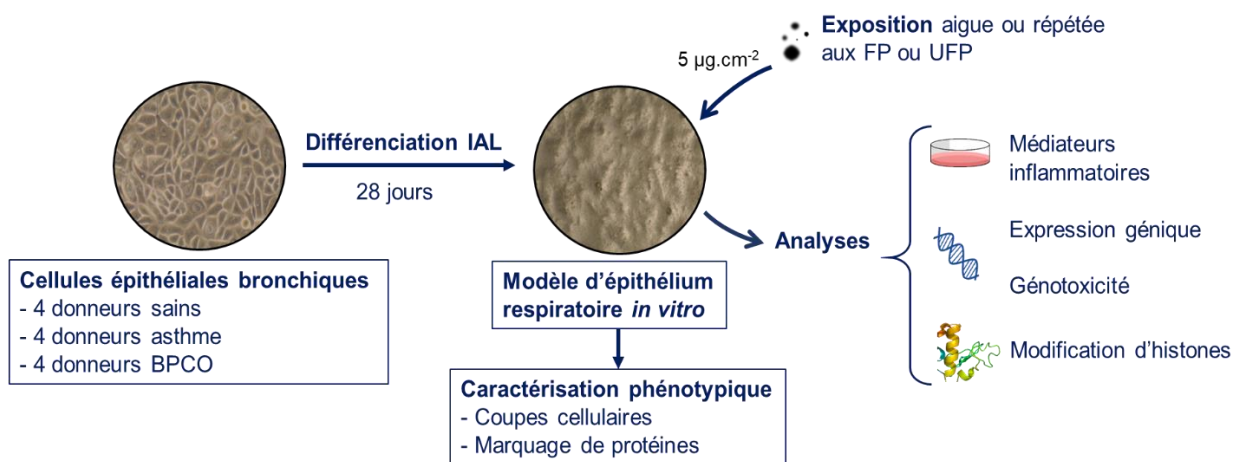


Figure 33 : Protocole d'analyse sur cultures primaires : Etudes exploratoires

3.3. Cytotoxicité

3.3.1. Dosage de l'ATP intracellulaire

La cytotoxicité suivant l'exposition a été analysée par la mesure de la concentration d'ATP intracellulaire avec le kit CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay (Promega, Wisconsin, USA). Le principe du test est basé sur l'oxydation de la luciférine, catalysée par la luciférase en présence d'ATP, d' O_2 moléculaire et de Mg^{2+} . Cette réaction conduit à la formation de l'oxyluciférine et de photons (Figure 34). La luminescence issue de la réaction est donc proportionnelle au contenu en ATP, représentative de l'activité métabolique, et par extension de la viabilité cellulaire. Les cellules ont été lysées directement dans leur insert par le tampon du kit, puis le lysat a été transféré dans une plaque 96 puits blanche à fond transparent (Greiner Bio-One) pour l'analyse.

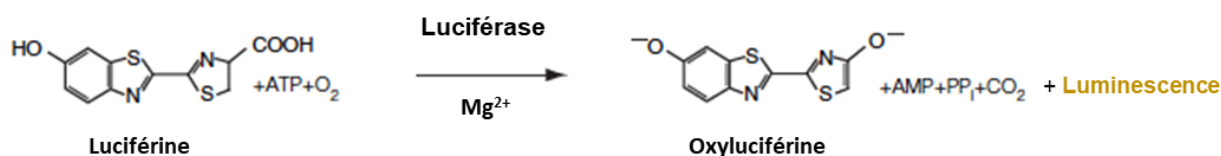


Figure 34 : Réaction de bioluminescence par oxydation de la luciférine en présence d'ATP, modifié d'après le manuel du kit CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay

3.3.2. Dosage de la G6PD extracellulaire

La cytotoxicité a également été évaluée par dosage de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) dans le milieu de culture avec le kit Vibrant™ Cytotoxicity assay (Molecular Probes, Oregon, USA). Cette enzyme étant exclusivement intracellulaire, sa libération dans le milieu de culture témoigne d'une perméabilisation membranaire observée durant l'apoptose ou la nécrose. Le principe du test est basé sur une réaction enzymatique impliquant la G6PD, qui mène à la réduction de la résazurine en résorufine, un composé fluorescent (Figure 35). L'intensité de la fluorescence ainsi mesurée est donc proportionnelle à la quantité de G6PD dans le milieu de culture. Les signaux de luminescence et de fluorescence ont été lus avec le spectromètre GloMax®-Multi Detection System (Promega). Les valeurs ont été normalisées par rapport à la concentration en protéines totale dans chaque puits, analysée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

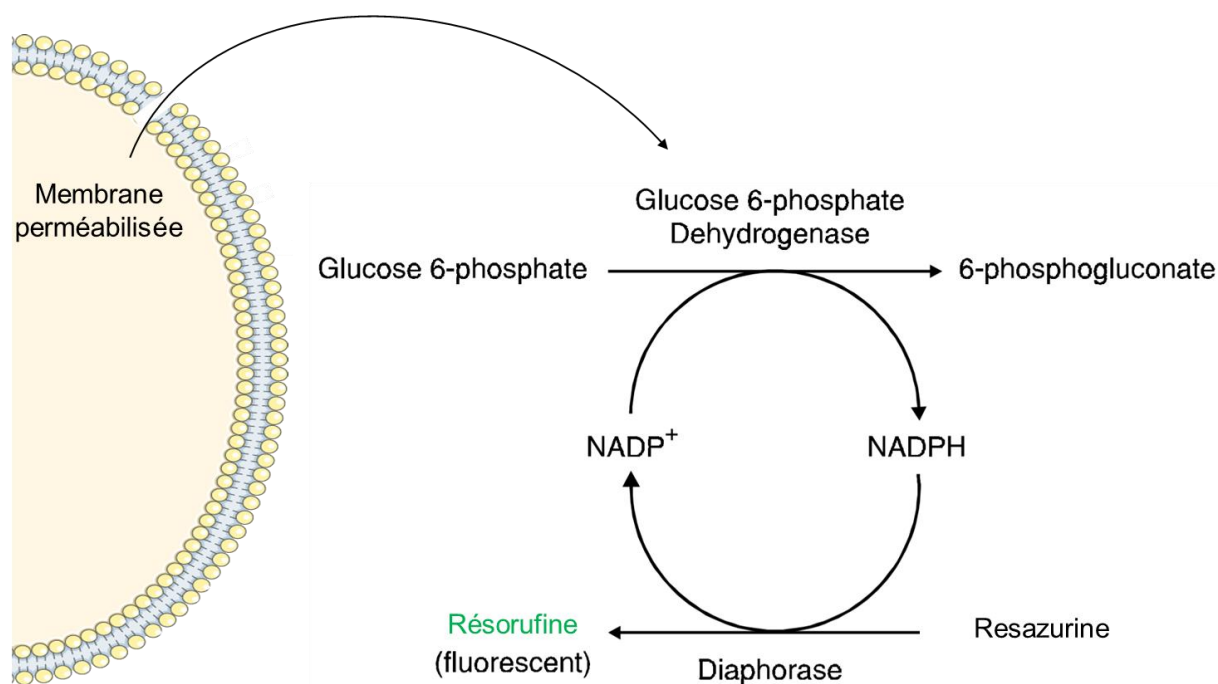


Figure 35 : Principe du dosage de la G6PD dans le milieu de culture. L'oxydation de la G6P par la G6PD conduit à la génération de NADPH, qui induit à son tour la réduction de la résazurine en résorufine, un composé fluorescent, modifié d'après le manuel du kit Vibrant™ Cytotoxicity assay

3.4. Quantification des cytokines dans le milieu de culture

Les concentrations en Interleukine 1 (IL-1), Interleukine 6 (IL-6), Interleukine 8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), Transforming Growth Factor- α , Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) ont été quantifiées dans les milieux de culture, en suivant les instructions du kit Milliplex® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - HCYTOMAG-60K (Merck). Le principe du test est basé sur la technologie MILLIPLEX MAP®. Les cytokines sécrétées dans le milieu de culture sont reconnues simultanément par un cocktail d'anticorps spécifiques couplés à un complexe streptavidine/phycoerythrine qui produit de la fluorescence (Figure 36). Les Intervalles de détection sont présentées dans le Tableau 7. La lecture de fluorescence a été réalisée avec le système Luminex MAGPIX® (Merck), et les données extraites avec le MILLIPLEX® Analyst 5.1 software (Merck).

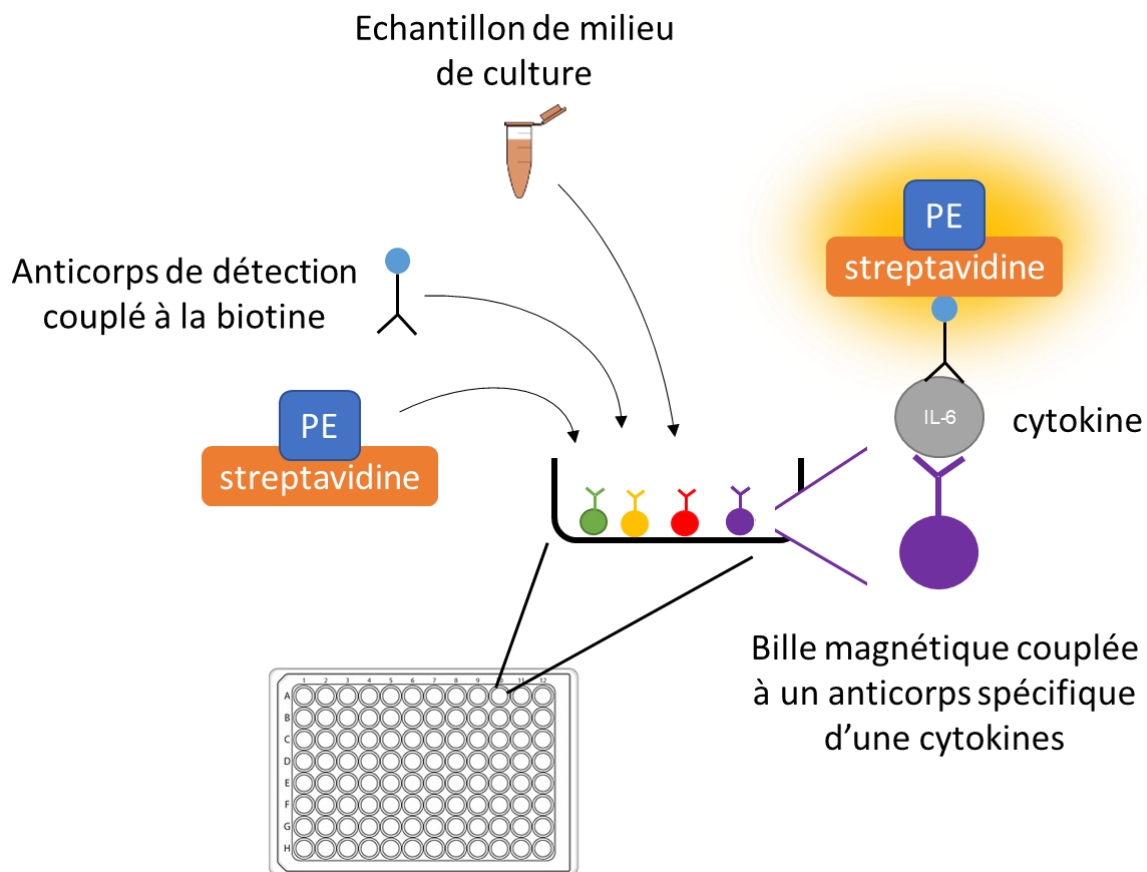


Figure 36 : Principe de la technologie du multiplex utilisée pour le dosage des cytokines sécrétées dans le milieu de culture

Tableau 7 : Intervalles de détection des cytokines du kit HCYTOMAG-60K

	GMCSF	IL13	IL1b	IL6	IL8	MCP1	RANTES	TNFa
Seuil bas (pg/ml)	21	0	10	10,5	16	56	6,5	2
Seuil haut (pg/ml)	7043	2648	21760	23221	38993,5	40372	33025,5	14288

3.5. Acétylation des histones

3.5.1. Dosage des histones acétylés

L'acétylation des histones a été mesurée en quantifiant l'expression des protéines H3K9, H3K27 et H3 total par western blot. Les histones ont été extraits et purifiés en suivant les instructions du kit Histone extraction kit (Active Motif, Carlsbad, USA). Les électrophorèses ont été réalisées sur des gels SDS-PAGE 4-12% bis-tris

(Thermofisher Scientific) avec 3 µg d'extrait d'histone par échantillon. Une fois la migration terminée, les gels ont été transférés sur des membranes en nitrocellulose. Les membranes ont été saturées avec une solution de lait écrémé (5% v/v) et de Tween® 20 (0,1% v/v) dans du Tris-Buffered Saline (TBS) pendant 45 min, puis incubées 12h à 4°C avec les anticorps primaires dilués au 1/1000^{ème} dans la même solution, selon les recommandations du fournisseur. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois 5 min au Tween® 20 (0,1% v/v dans du TBS), puis incubées 1h avec les anticorps secondaires dilués au 1/10000^{ème} dans la solution de saturation. Enfin, les membranes ont été lavées trois fois 5 min et le signal a été lu avec l'ECL prime Western Blotting Detection reagent (GE Healthcare, Chicago, USA) en utilisant l'imageur Fusion FX Spectra (Vilbert-Lourmat, Marne la-Vallée). Les anticorps utilisés ont été les suivants : rabbit monoclonal anti-human acetyl Histone H3 (Lys9) (C5B11) (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), rabbit monoclonal anti-human Histone H3 antibody (1B1-B2) (Bio-Techne, Minneapolis, USA), rabbit polyclonal anti-mouse IgG HRP conjugated Antibody (Bio-Techne) et goat polyclonal anti-rabbit IgG HRP conjugated antibody (Bio-Techne).

3.5.2. Activité histone acétyltransférase (HAT) et histone désacétylase (HDAC)

L'activité enzymatique des histones acétyltransférases a été mesurée en utilisant le kit HAT Assay (Active Motif). Ce test fonctionne avec un substrat peptidique constitué d'histones H3 et H4 et d'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA). Durant la réaction, les HAT catalysent le transfert des groupements acétyles de l'acétyl-CoA jusqu'au substrat d'histones. Cette réaction conduit à l'acétylation du substrat d'histones et à la formation de Coenzyme A (CoA-SH). La solution du kit réagit avec le groupement –SH de la CoA-SH en produisant de la fluorescence.

L'activité des histones désacétylases a été mesurée en utilisant le kit HDAC Assay (Active Motif). Cette technique utilise un substrat peptidique contenant des lysines acétylées et des fluorophores. Une fois le substrat désacétylé par les HDAC, les lysines réagissent avec la solution du kit, et les fluorophores sont libérés du substrat en produisant de la fluorescence. La lecture du signal fluorescent a été réalisée avec le GloMax®-Multi Detection System (Promega).

3.6. Génotoxicité

L'étude de la génotoxicité des PF et PUF a fait l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. La génotoxicité a été évaluée sur les cellules du groupe NHBE et sur deux types de lignées cellulaires épithéliales bronchiques : la lignée non cancéreuse BEAS-2B et les NCI-H292, dérivées d'un carcinome mucoépidermoïde. Compte tenu d'une quantité de matériel biologique limitée, les analyses de génotoxicité n'ont pas été effectuées sur les modèles DHBE-asthme et DHBE-BPCO au cours de ce travail.

3.6.1. Test des comètes

Le test des comètes a été effectué après exposition des tapis cellulaires confluents à l'IAL durant 4 h, à 5 µg/cm² de PF ou de PUF. Le temps de culture à l'IAL précédant l'exposition était de 21 jours pour les NHBE et de 4 jours pour les deux types de lignées cellulaires. Immédiatement après l'exposition, les cellules ont été lavées 2 fois au PBS puis récupérées dans 1 ml de trypsine-EDTA pour les NHBE et de TrypLE™ Express pour les lignées cellulaires. L'action de la trypsine a ensuite été stoppée en ajoutant 1 ml/puits de Trypsin Neutralizing Solution (TNS, Lonza) pour les NHBE, 1 ml de RPMI 10 growth medium (Thermofisher) pour les NCI-H292 cells, ou 1 mL de Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM, Lonza) pour les cellules BEAS-2B. Enfin, les cellules ont été centrifugées à 1000 rotations par minute (rpm) durant 5 min, pour éliminer le surnageant. Les culots cellulaires ont immédiatement été utilisés pour effectuer le test des comètes. Les témoins positifs ont été traités à 15 µg/ml de Methyl MethaneSulfonate (MMS, CAS No. 66-27-3) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Le test des comètes a été effectué en milieu basique (pH>13). 10⁴ cellules vivantes ont été mélangées à 75 µl d'agarose (0,5 % m/v) à 37°C, puis rapidement transférées sur de lames précoatées avec une couche d'agarose à deux concentrations différentes (1 lame à 1,5% m/v et 1 lame à 0,8% m/v). Les lames ont ensuite été immergées dans un tampon de lyse à 4°C (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, pH 10, supplémenté avec 1 % de Triton X-100 v/v et 10% de DMSO v/v). Après la lyse, les lames ont été lavées et équilibrées 2 x 5 min avec un tampon enzymatique (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8),

puis lavées à l'eau distillée. Les lames ont ensuite été placées dans des cuves d'électrophorèse remplies avec un tampon d'électrolyse (1 mM EDTA et 300 mM NaOH, pH>13), et laissées dans les cuves 20 min pour dénaturer l'ADN. L'électrophorèse a été réalisée à 4°C durant 20 min. Après l'électrophorèse, les lames ont été neutralisées pendant 10 min dans une solution de 0,4 M Trizma base, à pH 7.5, puis les gels ont été déshydratés par immersion dans l'éthanol absolu 2 x 5 min. Enfin, les lames ont été analysées en aveugle après ajout de 25 µl d'iodure de propidium (20 µg/mL dans l'eau distillée) et d'une lamelle. Les lames ont été observées au grossissement 250X avec un microscope à fluorescence (Leica Microsystems SAS - DM 2000, Heerbrugg, Suisse) connecté à une caméra monochrome CCD IEEE1394 (Allied Vision Technologies, Stadroda, Allemagne) reliée au logiciel Comet Assay IV Image Analysis System, version 4.11 (Perceptive Instruments Ltd, Suffolk, United Kingdom). 4000 cellules sélectionnées aléatoirement ont été scorées par condition. Les dommages à l'ADN ont été exprimés comme le % d'ADN dans la queue de la comète. Le Mann-Whitney U-test a été utilisé pour comparer les différents groupes. Les différences avec un $p < 0,05$ ont été considérées significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView® V5.0 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Caroline du Nord, USA).

3.6.2. Test des micronoyaux

Le test des micronoyaux *in vitro* nécessite au minimum 1,5 à 2 divisions cellulaires pour induire la formation de micronoyaux (OCDE test guideline n°487, 2014). Les cellules cultivées en IAL se différencient mais ne se divisent plus. Par conséquent, le test des micronoyaux a été effectué sur les cellules cultivées en conditions immergées. Pour se faire, les NHBE et les cellules BEAS-2B ont étéensemencées à $1,5 \times 10^5$ cellules dans des plaques 6 puits (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) coatées avec une solution de 0,03 mg/ml de collagène 1 de queue de rat (ThermoFisher Scientific), avec du milieu BEGM. Les NCI-H292 ont étéensemencées à 3×10^5 cellules par puits dans du milieu RPMI 10 growth medium dans les plaques 6 puits. Pour induire une croissance exponentielle et une adhésion cellulaire maximale, les cellules ont étéensemencées 24 h (NHBE) ou 48 h (BEAS-2B et NCI-H292) avant le traitement. Les cellules ont ensuite été traitées à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PF ou de PUF diluées

dans le milieu de culture (2 ml par puits) durant 24 h, puis lavées au PBS. Du milieu de culture sans particules a ensuite été ajouté et les plaques ont été incubées à 37°C pour une période de récupération de 5 jours pour les NHBE (24h expo + 120h récupération), ou 2 jours pour les lignées cellulaires (24h expo + 48h récupération). A la fin du temps de récupération, la collecte des cellules a été réalisée en suivant le même protocole que pour le test des comètes. La mitomycine C (MMC, CAS No. 50-07-7, Sigma-Aldrich) a été utilisée comme témoin positif à 0,05 µg/ml. Après l'étape de collecte, les culots cellulaires ont été traités avec une solution hypotonique (BEGM dilué au 1/3 v/v dans l'eau distillée pour les cellules NHBE et les cellules BEAS-2B) durant 10 min pour les cellules NHBE et 8 min pour les cellules BEAS-2B, et avec du milieu RPMI 10 dilué au 1:1 v/v dans l'eau distillée durant 7,5 min pour les cellules NCI-H292. A la fin du choc hypotonique, une étape de préfixation a été réalisée en ajoutant lentement 500 µl/tube de solution de Carnoy (mélange ethanol/acide acétique 3 /1 v/v) diluée à 5% dans le milieu de culture (BEGM ou RPMI 10). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min et les culots cellulaires ont été fixés durant 15 min avec la solution de Carnoy pure (cette étape a été répétée une seconde fois pour les NHBE). Après une seconde centrifugation, les cellules ont été étalées sur des lames en verre et séchées durant la nuit à température ambiante. Le lendemain, les cellules ont été marquées pendant 10 min avec 2% (NHBE) ou 4% (BEAS-2B et NCI-H292) de colorant Giemsa (Sigma-Aldrich) spécifique des chromosomes, lavées à l'eau distillée et séchées à température ambiante. Les expositions ont été réalisées en double (2 puits par condition). Pour chaque puits de cellules, 2 lames ont été préparées (4 lames en tout par condition). Les micronoyaux ont été identifiés à un grossissement de 500x, sur la base de 1000 cellules intactes mononuclées. La significativité statistique des différences entre les groupes (non exposés vs exposés) a été déterminée en utilisant le test du Chi². Les différences avec un $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Les tests des comètes et des micronoyaux ont été couplés à des tests de cytotoxicité, respectivement, par coloration d'exclusion au bleu de trypan, et par un calcul du pourcentage du doublement de population relatif. Dans chaque cas, les lames ont été codées indépendamment et analysées à l'aveugle.

3.7. Analyse pangénomique

L'extraction des ARN totaux a été réalisée par une technique de purification sur colonne, en suivant les instructions du kit AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France). Les ARN extraits ont été confiés à la plateforme de transcriptomique du Centre Biologie Pathologie de Lille (CBP), pour une analyse par microarray (puce à ADN). Cette technique permet le screening de l'expression de plusieurs milliers d'ARN messagers (ARNm). Des séquences nucléotidiques complémentaires des ARNm analysés (ADN complémentaire (ADNc)) sont fixées de manière covalente au fond des micro-puits de la puce ADN. Les ARNm de nos échantillons ont été marqués avec un fluorochrome qui émet de la fluorescence quand l'ARNm vient s'hybrider à l'ADNc. La quantité de fluorescence est ensuite détectée dans chaque micro-puits par un détecteur pour obtenir un profil d'expression génique (Figure 37).

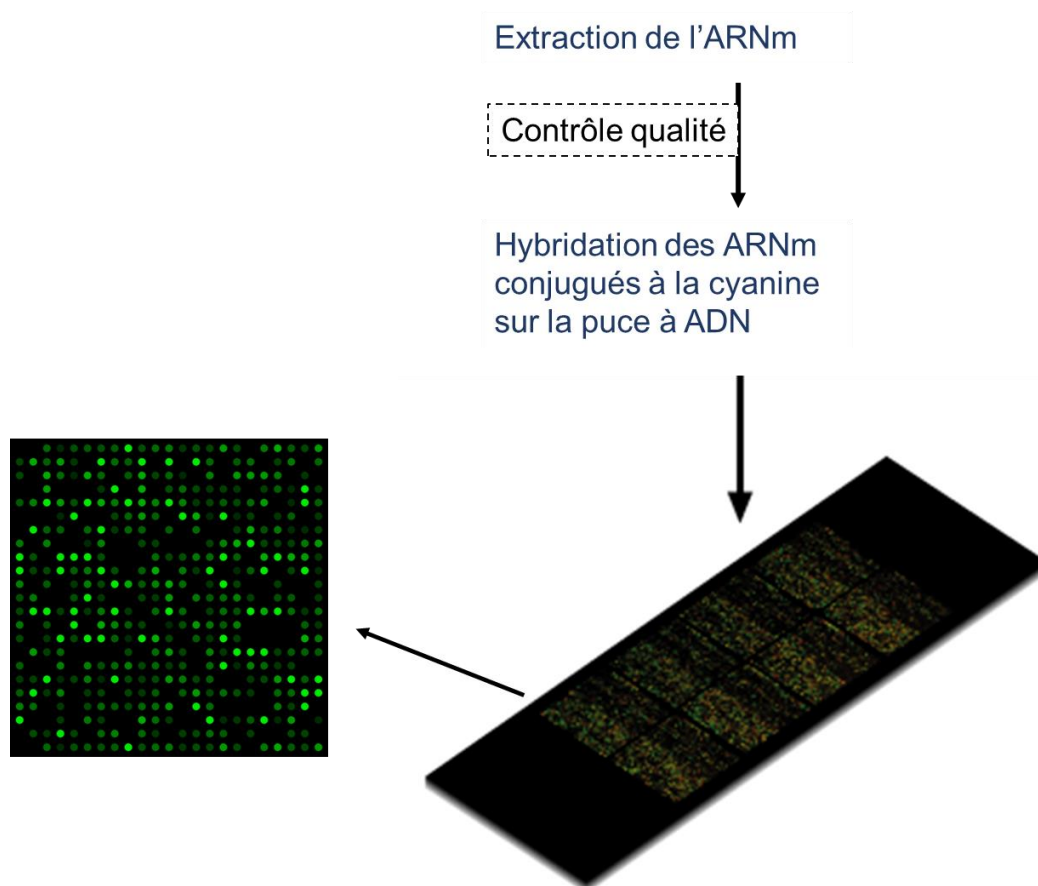


Figure 37 : Aspect d'une puce à ADN (microarray) scannée. Chaque micro-puits correspond à l'analyse de l'expression d'un gène

La qualité des ARNm a été évaluée sur l'Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) puis l'expression génique a été analysée sur des plaques One color whole Human (039494 slides) 60-mer oligonucleotides 8x60k microarrays (Agilent Technologies). Pour chaque échantillon, des ARNc marqués à la Cyanine-3 ont été synthétisés avec le kit de marquage QuickAMP à partir de 25ng d'ARN totaux. Des ARN Spike-In ont été ajoutés dans tous les tubes et utilisés comme contrôles positifs du marquage et de l'amplification. Les ARNc marqués ont été purifiés et 600 ng de chaque ARNc ont été hybridés et lavés en suivant les instructions du fabricant. Les microarrays ont été scannés sur l'Agilent G2505C et les données ont été extraites avec le logiciel Agilent Feature Extraction Software© (FE version 10.7.3.1).

3.8. Analyses statistiques

Toutes les analyses, excepté les tests de génotoxicité, ont été réalisées avec 4 patients de chaque phénotype (n=4). Pour l'analyse par microarray, le filtrage des données et les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Genespring® version GX13.0. (Agilent Technologies). L'analyse a porté d'une part sur le différentiel d'expression génique ou Fold Change (FC) entre les contrôles des groupes ASTHME et BPCO et ceux du groupe SAIN, et d'autre part entre les exposés et les contrôles de chaque groupe. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le package linear models for microarray data (limma) version 3.22.7 [244] en utilisant le « moderated t statistics » avec des données normalisées. Les gènes retenus pour l'analyse ont été ceux avec un [FC] significativement supérieur à 1,5, avec un risque alpha (p value) < 0,01 non corrigé pour comparaison multiple. Pour l'analyse de la sécrétion de cytokines, les résultats ont été normalisés par rapport au contrôle pour chaque lot de cellules, pour avoir une moyenne des témoins égale à 1. Un test non paramétrique de Kruskal Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn's a été utilisé pour comparer la réponse des groupes ASTHME et BPCO à celle du groupe SAIN, et celle des contrôles par rapport aux exposés pour chaque type d'exposition. Les variations ont été retenues significatives à partir d'un risque alpha < 0,05. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel PRISM v7 (Graph Pad, San Diego, USA).

4. Caractérisation de la fonction mitochondriale

4.1. Culture des cellules BEAS-2B

La lignée cellulaire bronchique humaine BEAS-2B (ATCC, Virginie, USA) a été utilisée pour les analyses de la fonction et de la dynamique mitochondriale. Les cellules BEAS-2B ont d'abord été cultivées dans des flasques T75 CellBind. Après l'obtention de 80% de confluence, les cellules ont été transférées dans (en fonction des expérimentations) des plaques 6 puits CellBind (Corning®, New York, USA), ou des plaques XFe24, (Agilent Technologies, Massy, France), ou des plaques 96 puits blanches à fond transparent (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Autriche) pour réaliser les expositions. Les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu de culture synthétique défini LHC-9, complété par une solution de pénicilline/streptomycine à 1% v/v. L'entretien des cultures a été réalisé en suivant les recommandations du fournisseur.

4.2. Exposition des cellules BEAS-2B

Les particules ont été directement diluées dans le milieu de culture pour exposer les lignées cellulaires à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (ou $24 \mu\text{g}/\text{ml}$). Le milieu de culture a été complété avec 1% v/v d'amphotéricine-B. Les cellules BEAS-2B sont exposées au milieu LHC-9 seul, aux PF ou aux PUF, de manière aiguë ou répétée. Une exposition correspond à 24h de contact avec la solution de particules (Figure 38).

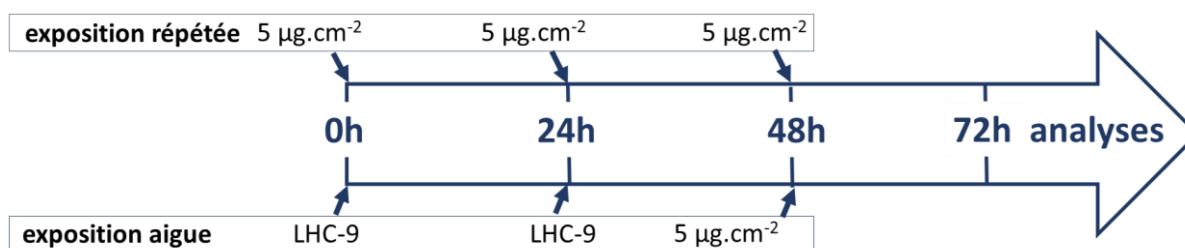


Figure 38 : Méthodologie d'exposition des cellules BEAS-2B aux particules (PF ou PUF) ; une exposition dure 24h. Les cellules du groupe « exposition aiguë » sont exposées à la solution témoin (milieu LHC9) les deux premiers jours. Les cellules du groupe contrôle sont exposées à la solution témoin durant les 3 jours.

Les analyses par cytométrie en flux, ou pour la mesure de la consommation d'oxygène ont été réalisées directement 24h après la dernière exposition. Pour les analyses par western blot, les cellules ont été récupérées dans du tampon RIPA (i.e. 142 mM KCL, 5 mM MgCl₂, EDTA 1 mM, glycérol 5% v/v, SDS 0,1% v/v, NP40 1% v/v, HEPES 20 mM dans de l'eau ultrapure) supplémenté à 10% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases/phosphatases MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), puis les échantillons ont été stockés à -80°C.

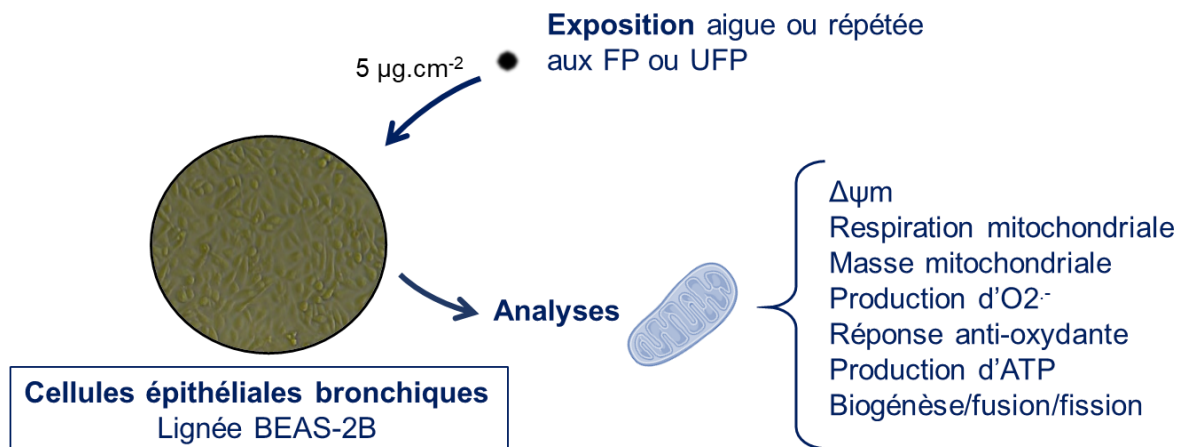


Figure 39 : Protocole d'analyse sur la lignée cellulaire BEAS-2B : Caractérisation de la fonction et du cycle dynamique des mitochondries

4.3. Cytotoxicité et apoptose

4.3.1. Perméabilisation membranaire (SYTOX®)

La perméabilisation des membranes cellulaires est un phénomène qui survient au cours de l'apoptose ou de la nécrose. La sonde fluorescente SYTOX® est un intercalant de l'ADN qui rentre dans les cellules perméabilisées. La lecture de la fluorescence a été réalisée par cytométrie en flux avec l'Attune NxT (ThermoFisher Scientific). Le SYTOX a été utilisé en co-marquage avec les sondes TMRM (cf. 5.2.4. Mesure du potentiel de membrane mitochondriale) et MitoSOX™ red (cf. 5.2.5. Mesure du stress oxydant mitochondrial) pour isoler les cellules vivantes lors de l'analyse.

4.3.2. Apoptose

L'induction de l'apoptose après exposition aux particules a été évaluée selon deux méthodes. La première consiste à mesurer l'activité des caspases 3, 7, 8 et 9, des protéines effectrices indispensables au processus apoptotique. L'activité des caspases a été mesurée en suivant les instructions des kits Caspase Glo® 3/7 Assay, Caspase Glo® 8 Assay, Caspase Glo® 9 Assay (Promega). Ces kits contiennent un tampon permettant de lyser les cellules, dans lequel se trouve de la luciférase et un substrat des caspases. Le clivage du substrat par les caspases libère de l'aminoluciférine, un substrat de la luciférase. Cette réaction conduit à la production de luminescence lorsque l'aminoluciférine est digérée par la luciférase. Un contrôle positif a été utilisé pour vérifier le fonctionnement du test : les cellules ont été traitées 4h avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour induire l'apoptose.

La deuxième méthode consistait à évaluer la fragmentation de l'ADN avec la technique du Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL). Les extrémités des brins d'ADN fragmentés comprennent des 3'-OH libres qui peuvent être marqués par des DeoxyUridines Triphosphates (dUTP) conjugués à un fluorochrome, la fluorescéine (FITC) (Figure 40). Le kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL system (Promega) a été utilisé pour marquer les cellules, et les noyaux ont été marqués par le DAPI SlowFade® Gold Antifade (Life Technologies). Un contrôle positif a été traité par de la DNase 1 à 1 µg/µl, conformément aux recommandations du fournisseur.

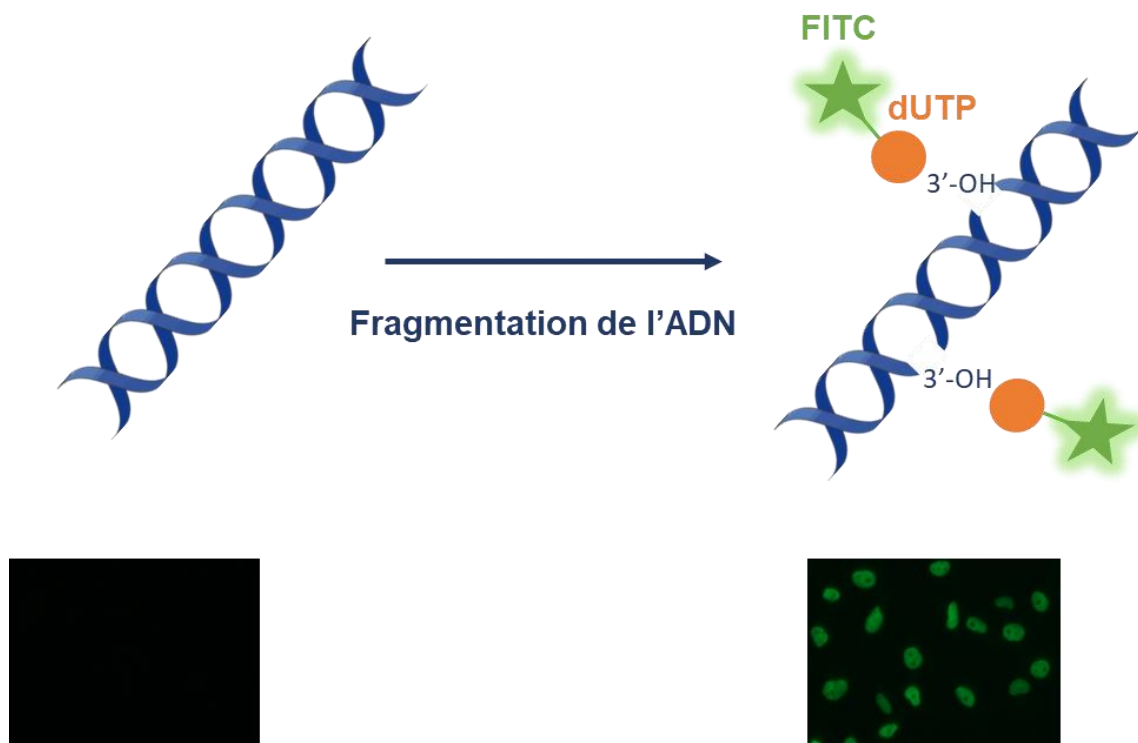


Figure 40 : Principe du test de fragmentation de l'ADN (TUNEL assay). Les noyaux cellulaires contenant de l'ADN fragmenté sont marqués par une fluorescence dans le vert (FITC).

4.4. ATP intracellulaire

Comme pour l'analyse sur cellules primaires, la concentration d'ATP intracellulaire a été mesurée en suivant les recommandations du kit CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay (Promega) (cf. 5.1.1. Cytotoxicité). Les valeurs de luminescence ont été normalisées par rapport à la concentration en protéines totale dans chaque puits, analysée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

4.5. Respiration mitochondriale

La cellule consomme de l'oxygène via la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et via d'autres réactions red/ox non mitochondriales. La consommation d'oxygène, ou Oxygen Consumption Rate (OCR), a été mesurée en temps réelle en pmol O₂/minute, grâce à un système de chambres hermétiques (plaques XFe24, Agilent) couplé à des sondes à oxygène présentes sur le système Seahorse XFe24 Extracellular Flux 210 Analyzer (Agilent). La mesure de l'OCR en réponse à l'ajout

séquentiel d'inhibiteurs ou d'activateurs de différents complexes de la CRM permet d'isoler la respiration d'origine mitochondriale et de déduire les différents processus qui consomment l'oxygène. (1) L'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthase (oligomycine) permet de déduire l'oxygène utilisé pour la production d'ATP. (2) L'ajout d'un agent découplant (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP)) inhibe le gradient de proton et la production d'ATP; la cellule fait alors face à une augmentation de la demande d'énergie et les réactions d'oxydation et la consommation d'O₂ sont à leur maximum. La FCCP est utilisée pour mesurer la capacité de réserve des mitochondries, c'est-à-dire la capacité des mitochondries à faire face à une augmentation de la demande en énergie. Enfin, (3) l'injection d'un mélange d'inhibiteurs de la CRM, via l'inhibition du complexe 1 par l'antimycine et du complexe 3 par la roténone permet d'obtenir la respiration non mitochondriale.

Après 3 jours d'exposition (cf. 4.2. Exposition des cellules BEAS-2B), le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées trois fois avec du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - D5030, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) supplémenté avec 10 mM de glucose, 2 mM de glutamine, 1 mM de pyruvate et tamponné à un PH de 7,35. Les cellules ont ensuite été incubées 30 min à 37°C en absence de CO₂, puis ont été mesurées : (1) la consommation d'oxygène basale, (2) la consommation d'oxygène après ajout d'oligomycine (1 µM), la consommation d'oxygène après ajout de FCCP (0,27 µM et 0,34 µM) et (3) la consommation d'oxygène après ajout de roténone et d'antimycine A (0,5 µM). Les valeurs d'OCR ont été normalisées par rapport à la concentration en protéines totale dans chaque puits, analysée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Le calcul des différents paramètres a été réalisé selon la méthode décrite par Divakaruni et al., 2014 [245] (Figure 41), (Tableau 8).

Tableau 8 : Interprétation des données d'OCR. D'après Divakaruni et al. [245]

Paramètre	Définition	Méthode de calcul
Respiration basale	La respiration mitochondriale utilisée pour la synthèse d'ATP et pour la fuite de proton	[Mesure précédant l'ajout d'inhibiteurs] – [respiration non mitochondriale]
Respiration liée à la production d'ATP	La respiration sensible à l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase)	[respiration basale] – [respiration liée à la fuite de protons]
Respiration liée à la fuite de proton	La force protomotrice n'est pas entièrement consommée par l'ATP synthase. Certains protons fuient et retournent dans la membrane interne en consommant le $\Delta\psi_m$, et stimulent l'activité de la chaîne de transport des électrons pour la maintenir	[mesure après injection d'oligomycine et précédant l'ajout de FCCP] - [respiration non mitochondriale]
Respiration maximale	Elle reflète la capacité totale d'oxydation dans la chaîne de transport des électrons. La FCCP perméabilise la membrane interne et dissipe le $\Delta\psi_m$. L'activité de la chaîne de transport des électrons augmente à son maximum pour maintenir la force protomotrice.	[respiration après injection de FCCP] – [respiration non mitochondriale]
Capacité de réserve	La différence entre la respiration maximale et la respiration basale. Utilisée pour faire face à une augmentation de la demande d'ATP	[respiration maximale] – [respiration basale]
Respiration non mitochondriale	Il existe des oxydases non mitochondriales. Des inhibiteurs des complexes 1 et 3, respectivement la roténone et l'antimycine A sont ajoutés pour stopper la chaîne respiratoire.	Mesure qui suit l'ajout du mélange roténone/ antimycine A

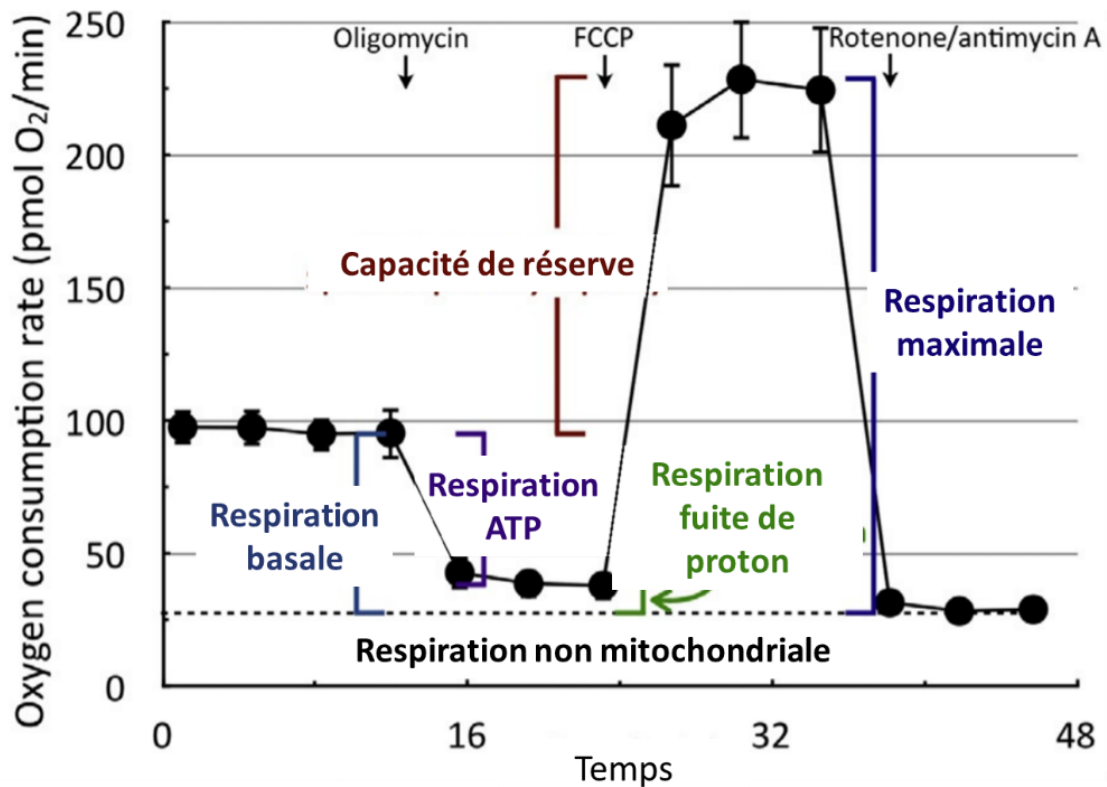


Figure 41 : Interprétation des mesures d'OCR, modifié d'après Divakaruni et al. [245]

4.6. Potentiel de membrane mitochondriale

L'expulsion des protons hors de la matrice mitochondriale par la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) entraîne une différence de potentiel ($\Delta\psi_m$) de part et d'autre de la membrane interne des mitochondries. Le $\Delta\psi_m$ est utilisé pour réinternaliser les protons au niveau de l'ATP synthase et entraîne la production d'ATP. Une diminution du $\Delta\psi_m$ est donc associée à une diminution du gradient de protons et de la fonction mitochondriale. Le $\Delta\psi_m$ a été mesuré par marquage des cellules avec la sonde Tétraméthylrhodamine, Méthyl Ester, Perchlorate (TMRM, ThermoFisher Scientific). Le TMRM est un colorant fluorescent chargé positivement, qui diffuse dans les mitochondries actives en utilisant le $\Delta\psi_m$. Une baisse de la fluorescence témoigne d'une diminution du $\Delta\psi_m$. Pour l'analyse, les cellules ont été lavées au PBS, puis incubées dans une solution de TMRM (25 nM dans du PBS) pendant 30 min à 37°C. Après incubation, les cellules ont été lavées au PBS, puis incubées 10 min avec du SYTOX™ blue (5 μ M). Un témoin positif a été traité avec 25 μ M de FCCP pendant 1h pour dissiper le $\Delta\psi_m$. L'analyse de la fluorescence a été faite sur les cellules vivantes

(population négatives au SYTOX), en utilisant le cytomètre Attune NxT (ThermoFisher Scientific).

4.7. Stress oxydant mitochondrial

La sonde MitoSOX™ red (ThermoFisher) a été utilisée pour détecter le stress oxydant d'origine mitochondrial. Cette sonde pénètre dans les mitochondries des cellules vivantes, et son oxydation par l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (mais pas par les autres ERO) produit de la fluorescence. L' $O_2^{\cdot-}$ est principalement produit par les mitochondries et son augmentation traduit un stress mitochondrial. Les cellules ont été lavées au PBS puis marquées pendant 30 min à 37°C avec le MitoSOX red (5 μ M dans du PBS). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS puis incubées 10 min avec du SYTOX™ red (ThermoFisher Scientific). Un témoin positif a été traité 2h avec 50 μ M de ménadione (Merck), un inducteur de stress oxydant mitochondrial. La lecture de la fluorescence a été faite sur le cytomètre Attune NxT (ThermoFisher Scientific) et les données extraites avec l'Attune NxT Software version 3.1 (ThermoFisher Scientific).

Pour confirmer l'induction d'un stress oxydant, et la localisation mitochondriale du MitoSOX, des cellules ont aussi été observées en microscopie à fluorescence après un co-marquage au MitoSOX red et au MitoTracker™ Green FM (ThermoFisher Scientific). Le MitoTracker™ Green FM est une sonde qui marque les mitochondries en vert, indépendamment du $\Delta\psi_m$ ou du stress oxydant. Pour se faire, les cellules ont étéensemencées sur des lames Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ 8 puits (ThermoFisher Scientific) à 100000 c/puits, exposées selon le protocole décrit, lavées et incubées 30 min à 37°C avec une solution de MitoTracker™ Green FM (70 nM) / MitoSOX (5 μ M) dans de l'HBSS. Après incubation, les cellules ont été lavées à l'HBSS, et montées sous lamelles avec le Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific). Les lames ont été observées avec le microscope EVOS® FL (Life Technology, Carlsbad, USA).

4.8. Réponse anti-oxydante

L'induction de la réponse anti-oxydante a été étudiée via la mesure de l'expression des enzymes anti-oxydantes (Hème Oxygénase-1 (HO-1), la NADPH Quinone Oxydoréductase 1 (NQO-1), Glutamate Cysteine Ligase (GCL)) inductibles par le facteur de transcription Nuclear Factor E2-Related Factor 2 (NRF2). L'expression des protéines a été quantifiée par western blot (cf. 5.2.7. Dynamique mitochondriale).

L'activité de liaison de la protéine nrf2 à l'ADN, représentative de son activité transcriptionnelle, a été mesurée avec le kit TransAM® Nrf2 (Active Motif). Ce kit fournit un substrat nucléotidique mimant la séquence ARE sur lequel les protéines nrf2 actives peuvent se lier. Les protéines nrf2 liées au substrat sont ensuite détectées avec un anticorps anti-nrf2 (Figure 42).

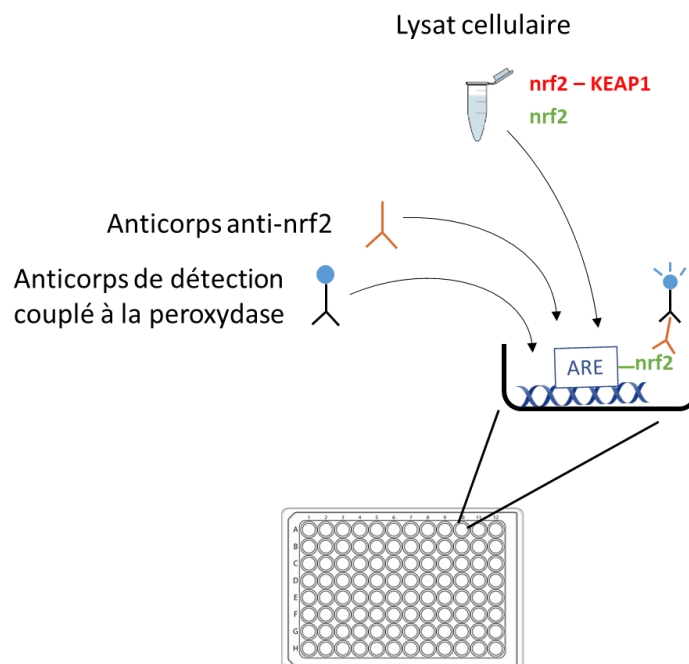


Figure 42 : Principe du kit TransAM® Nrf2 pour l'étude de l'activité de liaison de nrf2

4.9. Dynamique mitochondriale

L'expression des protéines d'intérêt, impliquées dans la fission/fusion mitochondriale (Tableau 9), a été analysée par western blot. Immédiatement après exposition en plaques 6 puits, les cellules ont été lysées dans 100 µl de tampon RIPA (i.e. 142 mM KCL, 5 mM MgCl₂, EDTA 1 mM, glycérol 5% v/v, SDS 0,1% v/v, NP40 1% v/v, HEPES 20 mM dans de l'eau ultrapure) supplémenté à 10% d'un cocktail d'inhibiteur de protéases/phosphatases MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). La concentration en protéines totale dans chaque puits a été analysée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Les électrophorèses ont été réalisées sur des gel SDS-PAGE 4-12% bis-tris (Thermofisher Scientific) avec 20 µg de protéines par échantillon. Une fois la migration terminée, les gels ont été transférés sur des membranes en nitrocellulose. Les membranes ont été saturées avec une solution de lait écrémé (ou de caséine pour les protéines phosphorylées) (5% v/v) et de Tween® 20 (0,1% v/v) dans du Tris-Buffered Saline (TBS) pendant 45 min, puis incubées 12 h à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans la même solution, à la concentration recommandée par les fournisseurs. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois 5 min au Tween® 20 (0,1% v/v dans du TBS), puis incubées 1 h avec les anticorps secondaires dilués dans la solution de saturation. Enfin, les membranes ont été lavées trois fois 5 min et le signal a été lu avec l'ECL prime Western Blotting Detection reagent (GE Healthcare, Chicago, USA) en utilisant l'imageur Fusion FX Spectra (Vilbert-Lourmat, Marne la-Vallée). Le Tableau 9 détaille la liste des anticorps utilisés dans l'étude.

Tableau 9 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot

Anticorps	Fournisseur	Rôle de la protéine	Dilution
Phospho-PGC1α (S571)	R&D system (Minneapolis, USA)	biogénèse mitochondriale	1/1000
PGC1α (M18) clone 2F10	Abnova (Taiwan)	biogénèse mitochondriale	1/1000
Nrf2 clone # 383727	R&D system (Minneapolis, USA)	réponse antioxydante	1/500
Ho-1 (GTS-1)	Novus Biologicals (Centennial, USA)	réponse antioxydante	1/1000
NQO-1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	réponse antioxydante	1/1000
TOMM20	Novus Biologicals (Centennial, USA)	masse mitochondriale	1/1000
VDAC1 (ab15895)	Abcam (Cambridge, UK)	masse mitochondriale	1/1000
Phospho-DRP1 (ser616)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	fission	1/1000
Phospho-DRP1 (ser637)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	inhibiteur de fission	1/1000
DRP1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	fission	1/500
OPA1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	fusion	1/500
Mitofusine 1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	fusion	1/1000
Mitofusine 2 (4h8)	Novus Biologicals (Centennial, USA)	fusion	1/1000
Total OXPHOS Rodent Cocktail (ab110413)	Abcam (Cambridge, UK)	Complexes OXPHOS	1/1000
FIS1 (GT9810)	GeneTex (Irvine, USA)	fission	1/100
β-actine clone # 937215	R&D system (Minneapolis, USA)	normalisation	1/50000
Anti-Rabbit IgG secondary antibody [HRP]	Novus Biologicals (Centennial, USA)	anticorps secondaire	1/10000
Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-conjugated Antibody	R&D system (Minneapolis, USA)	anticorps secondaire	1/10000

4.10. Analyses statistiques

Toutes les expérimentations sur les cellules BEAS-2B, comprenant la phase de culture, d'exposition et d'analyse ont été faites trois fois ($n = 3$) de manière indépendante. Les données ont été analysées avec le logiciel PRISM v7 (Graph Pad, San Diego, USA). Un test de Student (t test) a été utilisé pour comparer les groupes exposés aux groupes contrôles. Les valeurs ont été retenues significative à partir d'un seuil de $p < 0,05$.

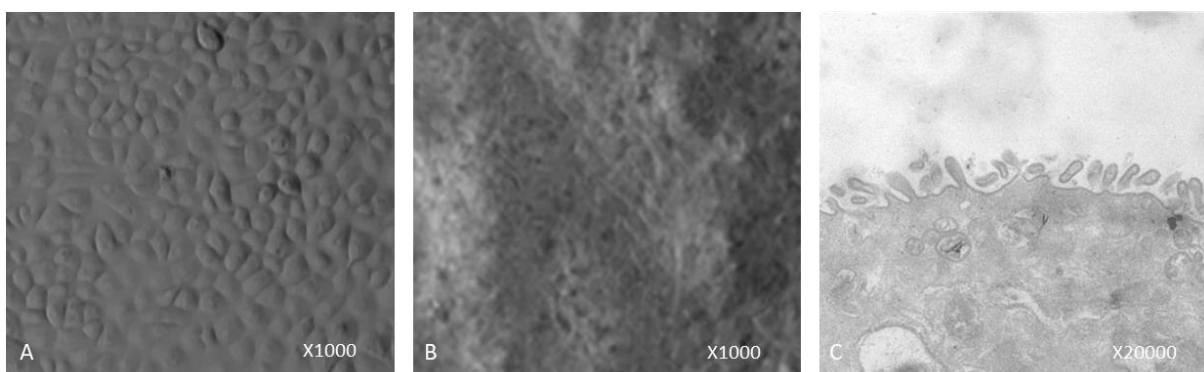
Résultats et discussions

1. Analyses sur cellules primaires

Le premier objectif de ce travail consistait à évaluer, à l'aide de modèles de cellules épithéliales bronchiques humaines différenciées à l'interface air liquide, l'effet d'une exposition aiguë ou réitérée à des faibles doses de $PM_{2.5-0.18}$ (PF) ou de $PM_{0.18}$ (PUF) sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, les modulations épigénétiques, la génotoxicité et les profils d'expression génique, en intégrant la sensibilité particulière des individus atteints d'asthme ou de BPCO.

1.1. Caractérisation des modèles *in vitro*

Les cellules provenant de tissus sains (Normal Human Bronchial Epithelial cells (NHBE)) ou pathologiques (Diseased Human Bronchial Epithelial cells (DHBE-asthme et DHBE-BPCO)) ont d'abord été cultivées en conditions immergées pour assurer leur prolifération jusqu'à confluence (Figure 43A). Après 28 jours de culture à l'Interface Air Liquide (IAL), les tapis cellulaires formaient des structures en relief caractéristiques (Figure 43B). La ciliation des cellules sur le pôle apical a été observée sur des coupes en microscopie électronique à transmission (Figure 43C).



*Figure 43 : Images de microscopie des modèles *in vitro* en IAL, (A) tapis cellulaire à confluence avant différenciation, (B) tapis cellulaire post différenciation à l'IAL, (C) coupe cellulaire montrant la ciliation sur le pôle apical, observations réalisées sur les NHBE*

Le marquage immuno-fluorescent de protéines caractéristiques de l'épithélium bronchique a permis de confirmer la différenciation cellulaire. L'expression de la cytokératine (PanCK) par toutes les cellules (Figure 44) confirme leur phénotype épithélial. La sécrétion de la mucine 5AC (Muc5AC), qui représente l'un des composants majeurs du mucus, révèle la présence de cellules caliciformes productrices de mucus (Figure 44, Figure 45). Enfin, l'expression de la protéine Zona Occludens-1 (Zo-1), dont la fonction principale est d'assurer l'étanchéité de l'épithélium, confirme l'intégrité des jonctions serrées (Figure 44).

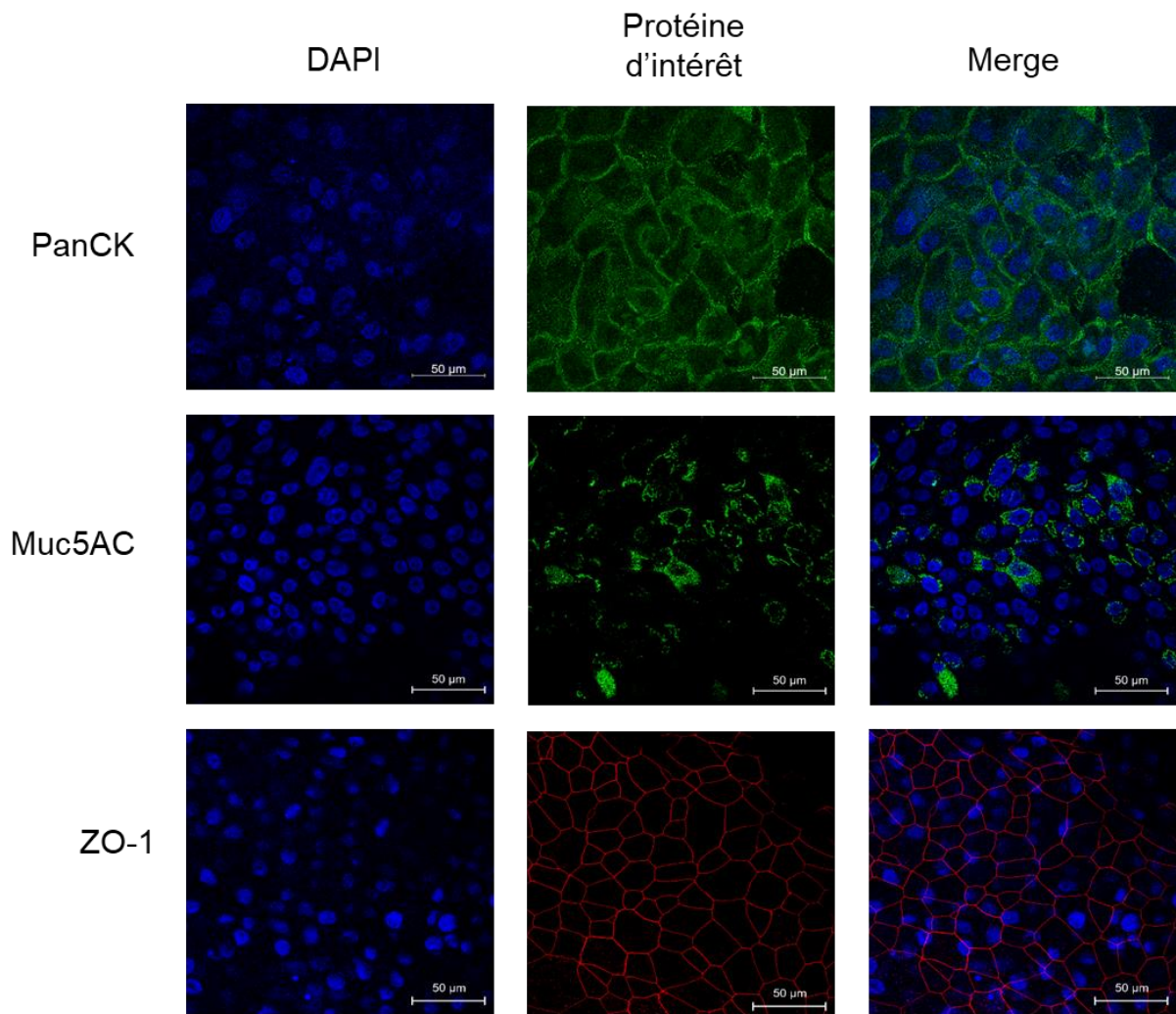


Figure 44 : Marquages immuno-fluorescents de marqueurs de différenciation, les noyaux cellulaire sont marqués au DAPI (bleu), les pancytokératines (PanCK) et les mucines-5AC (Muc5AC) sont marquées en vert, les zona occludens-1 (ZO-1) sont marquées en rouge, observations réalisés sur les DHBE-BPCO

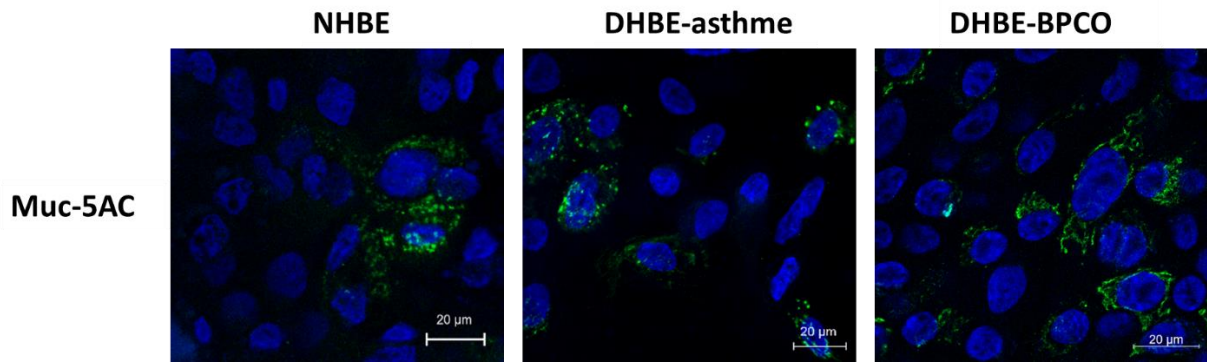


Figure 45 : Marquage immuno-fluorescent des Muc5AC observé dans les NHBE et les DHBE

1.2. Cytotoxicité

1.2.1. Concentration d'ATP intracellulaire

La Figure 46 montre les concentrations d'ATP intracellulaire des NHBE, des DHBE-asthme et des DHBE-BPCO, après exposition à 5 µg/cm² de particules fines (PF) ou ultrafines (UFP). Après une exposition aiguë, les PF n'ont pas altéré significativement la concentration d'ATP, tandis que les UFP ont induit une tendance à la diminution, avec une baisse significative dans le groupe des DHBE-BPCO ($p < 0,05$). Après l'exposition répétée, les deux fractions de particules (PF et PUF) ont induit une diminution d'ATP dans le groupe des NHBE et des DHBE-asthme, toutefois, seul la fraction PUF a entraîné une diminution significative dans les groupe des DHBE-BPCO ($p < 0,05$).

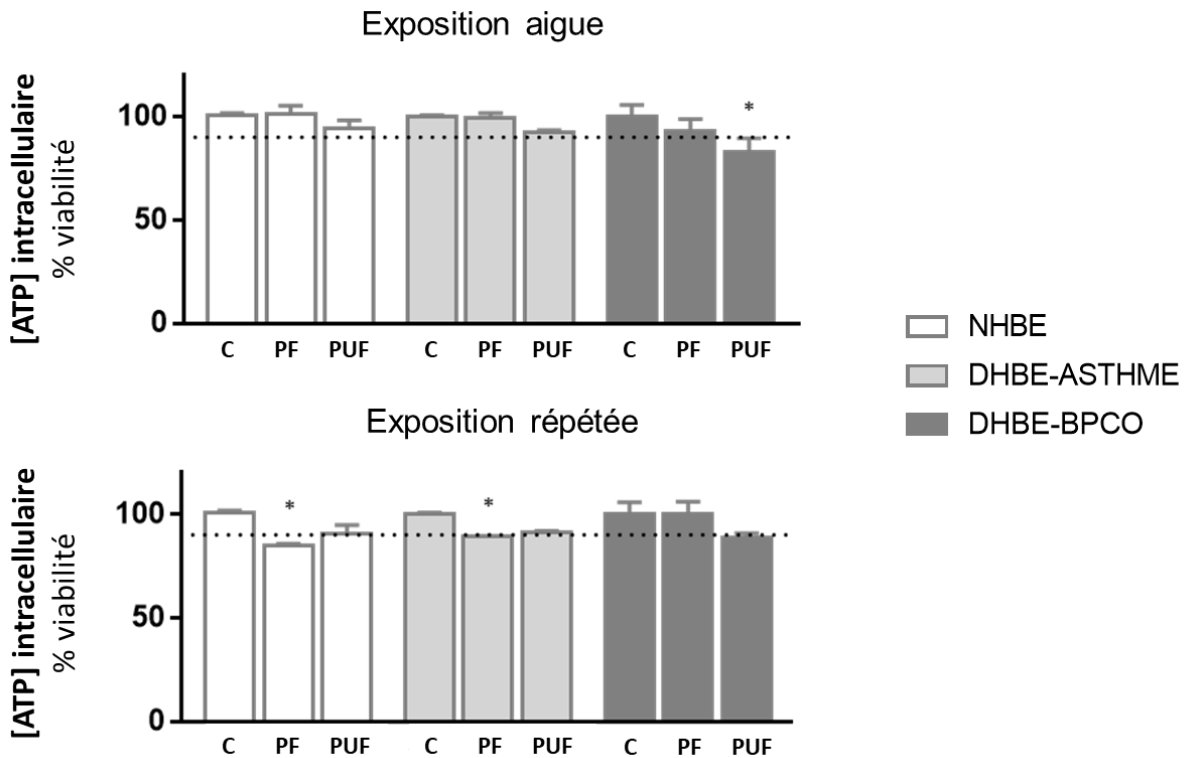


Figure 46 : Test de cytotoxicité par dosage de l'ATP intracellulaire, C : contrôle. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- erreur standard (SEM), n = 4, test de Kruskal Wallis, *p < 0,05 : seuil de significativité par rapport aux contrôle. La ligne en pointillés désigne une viabilité de 90% (dose létale pour 10% des cellules (DL10))

1.2.2. G6PD extracellulaire

La Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PD) est une enzyme intracellulaire impliquée dans le métabolisme. La détection d'activité G6PD dans le milieu de culture témoigne d'une perméabilité membranaire habituellement observée lors de l'apoptose ou la nécrose. Cette technique est moins sensible que le dosage d'ATP intracellulaire qui témoigne d'une altération du métabolisme. La Figure 47 montre une absence d'activité G6PD significative dans le milieu de culture des trois types cellulaires exposés à 5 µg/cm² de PF ou de PUF. Le fonctionnement du test a été validé par l'utilisation d'un lysat cellulaire comme contrôle positif (+), et du milieu de culture non consommé comme contrôle négatif (-).

L'absence de cytotoxicité significative montrée par les deux méthodes confirme que l'utilisation de la dose de 5µg/cm², dose sublétales dans nos modèles *in vitro*, est bien adaptée pour les analyses toxicologiques réalisées dans ce travail de recherche.

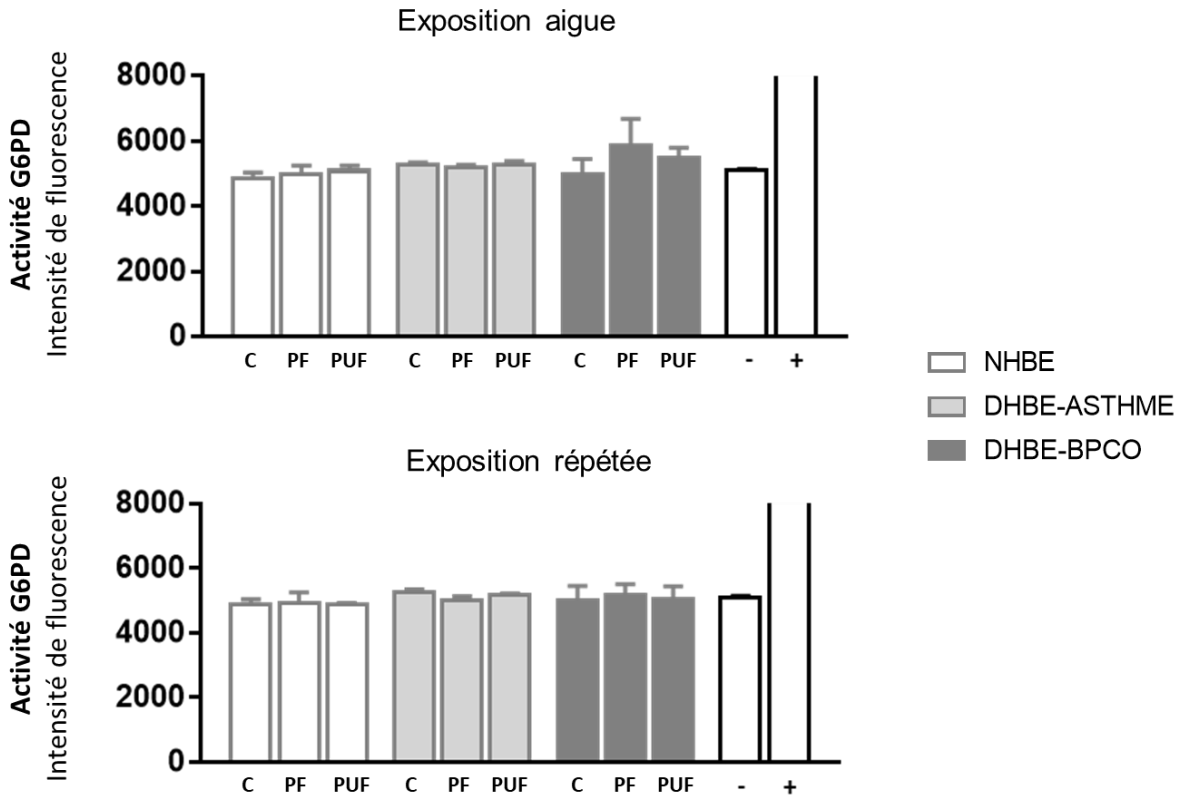


Figure 47 : Test de cytotoxicité par mesure de l'activité G6PD dans le milieu de culture. (-) milieu de culture non consommé, (+) lysat cellulaire. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- erreur standard (SEM)

1.3. Sécrétion de médiateurs inflammatoires

La concentration en cytokines a été mesurée dans les milieux de culture des NHBE, DHBE-asthme et DHBE-BPCO avant et après exposition aux particules. Aucune différence significative n'a été observée entre les 3 types cellulaires sur la quantité de cytokines sécrétées par les contrôles (à l'état basal) (Figure 48).

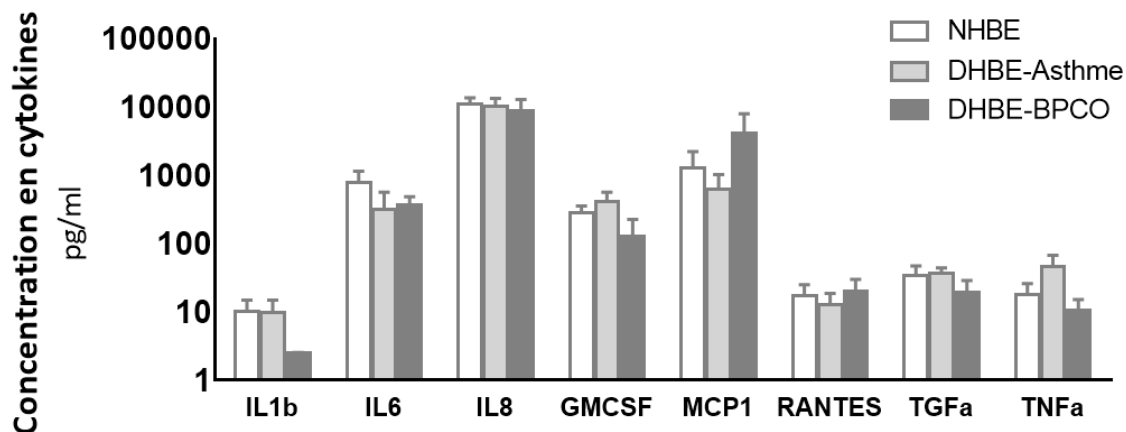
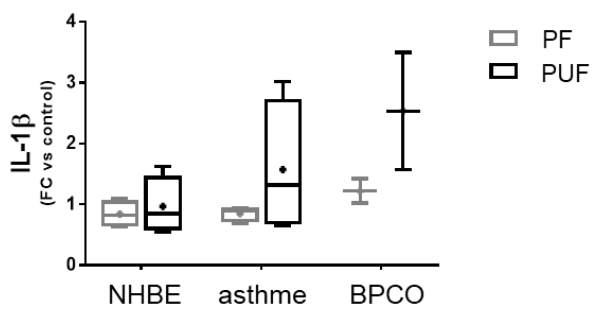
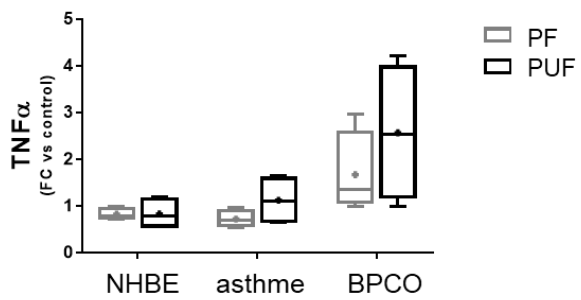
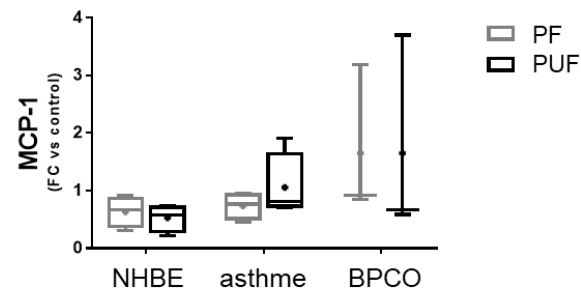
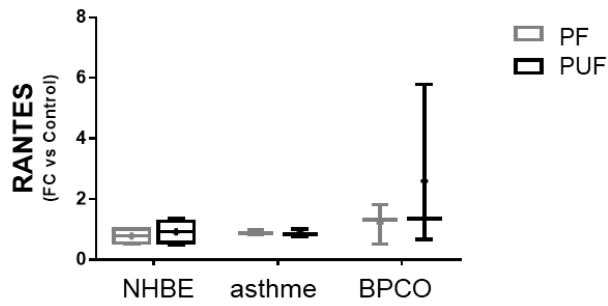
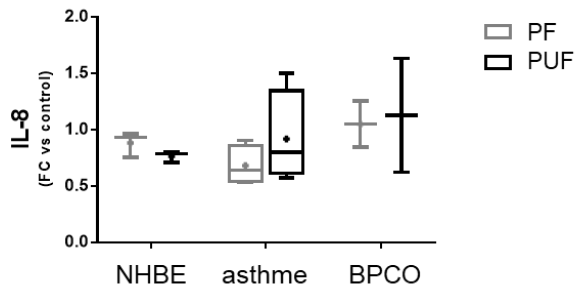


Figure 48 : Sécrétion de cytokine à l'état basal. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- erreur standard (SEM)

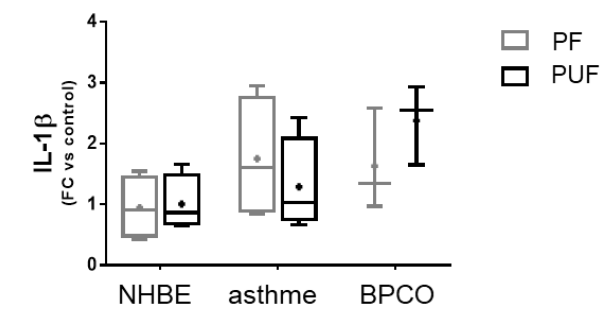
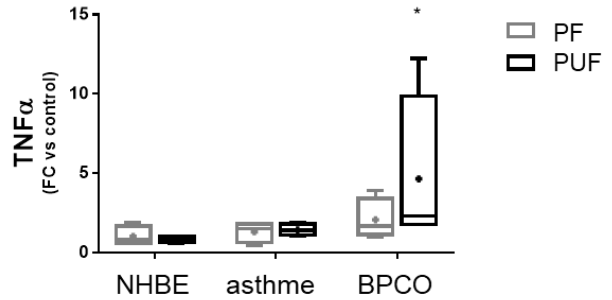
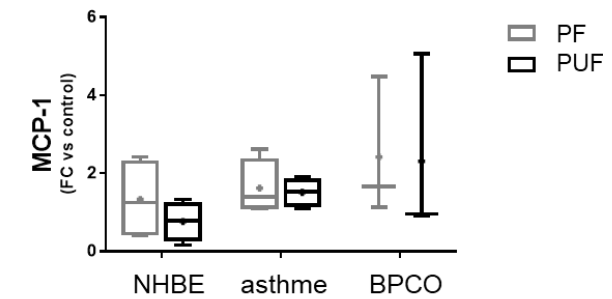
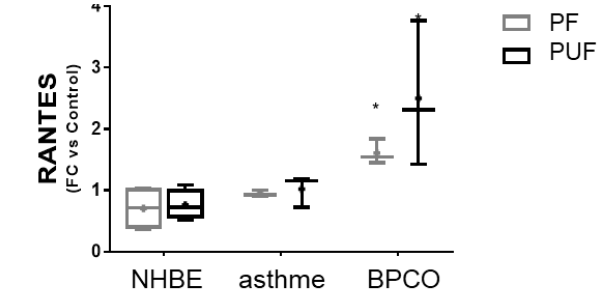
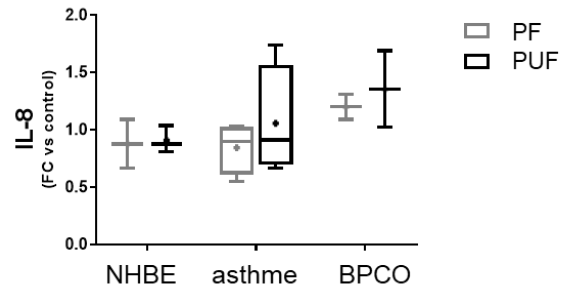
Les PF et les PUF n'ont pas induit de changement significatif dans le groupe des NHBE. En revanche, dans les groupes de cellules issues de tissus pathologiques, et particulièrement dans le groupe des DHBE-BPCO, l'exposition aux PF et aux PUF a induit une augmentation parfois statistiquement significative de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (i.e., TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF, MCP-1, et/ou TGF α), comparée à leurs contrôles respectifs et en outre, aux NHBE exposées (Figure 49). Par exemple, une légère augmentation de la sécrétion du TNF α a été observée après exposition aiguë des DHBE-asthme aux PUF. Une augmentation plus importante a été observée après exposition aiguë et répétée des DHBE-BPCO. Les deux protéines MCP-1 et GM-CSF, impliquées respectivement dans le recrutement des monocytes et des macrophages, ont un profil de sécrétion similaire à celui du TNF α . D'une manière générale, ces résultats suggèrent une sensibilité accrue des cellules dérivées d'épithélia de patients asthmatiques et particulièrement des cellules issues de patients atteints de BPCO. De plus, à quelques exceptions près, les PUF déclenchent une sécrétion de cytokines plus importante que les PF, indépendamment de la stratégie d'exposition (aiguë ou répétée). Enfin, Il est à noter que l'exposition répétée semble accentuer la sécrétion de certaines cytokines. C'est notamment le cas pour GM-CSF, RANTES, TGF- α et TNF- α dans le groupe des DHBE-BPCO, et pour IL-1 β et IL-6 dans le groupe des DHBE-ASTHME. Toutefois, l'observation de la médiane montre que ces modifications résultent parfois d'une modification issue d'un seul donneur par groupe (e.g. TNF α , MCP-1). Par conséquent, les tendances

observées ne sont généralement pas significatives compte tenu d'une variabilité de réponse relativement importante dans chaque groupe.

Exposition aiguë



Exposition répétée



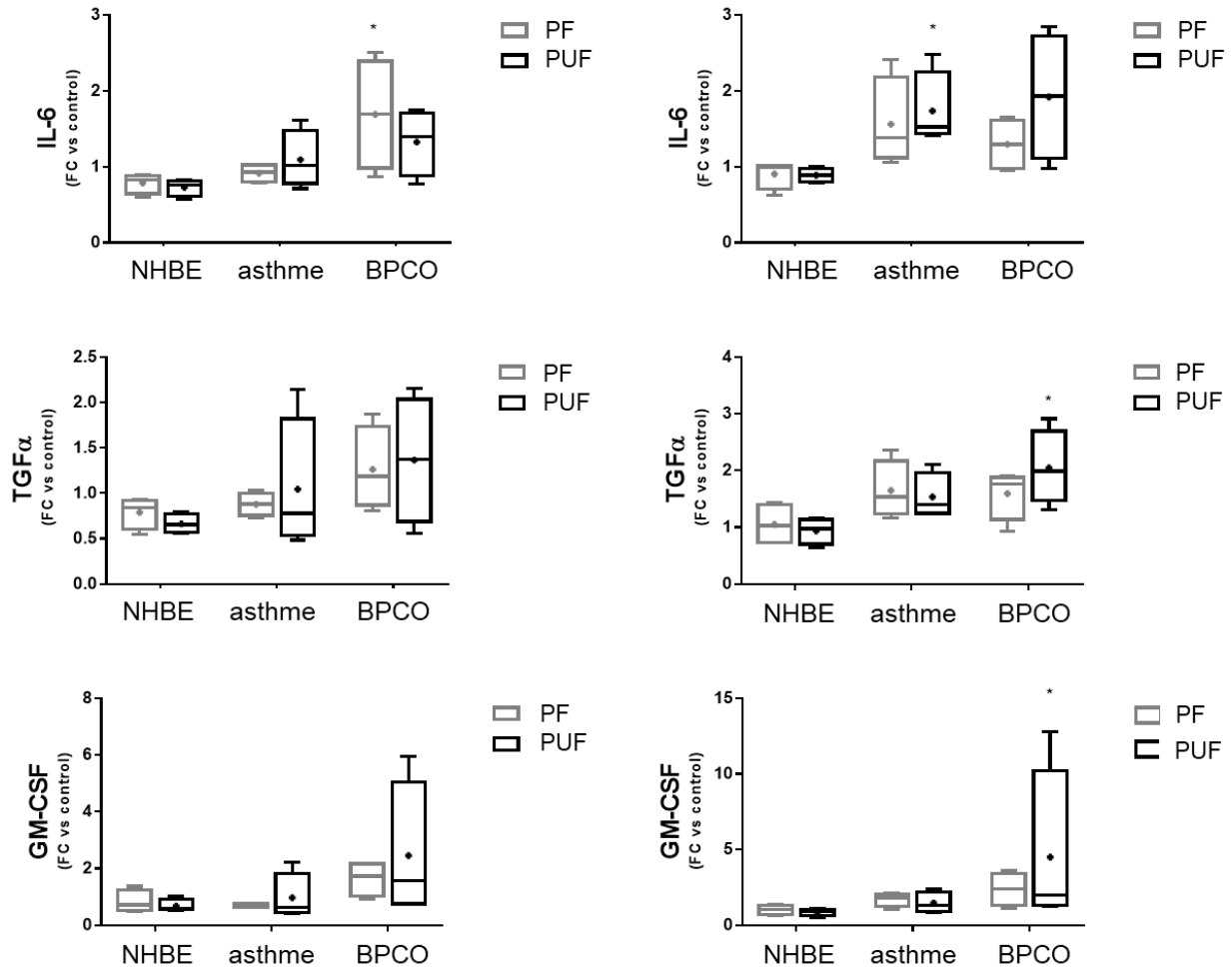


Figure 49 : Sécrétion de cytokines après exposition aiguë ou répétée aux PF ou aux PUF, FC : Fold Change par rapport au contrôle (= 1). Pour chaque condition, les graphes montrent la moyenne, représentée par un trait et la médiane, représentée par un point, de mêmes que les valeurs minimales et maximales et les 25 et 75^{ème} percentiles, n = 4, test de Kruskal Wallis, * p < 0,05 : seuil de significativité par rapport aux contrôle

1.4. Acétylation des histones

La Figure 50 montre la modification de l'activité des Histone AcétylTransférases (HAT), qui catalysent l'acétylation des histones, et de celle des Histone Désacétylases (HDAC), qui catalysent la réaction inverse, en réponse à l'exposition aux particules. Les PF et les PUF ont induit une tendance à la diminution de l'activité HDAC dans les trois groupes de cellules, avec pour conséquence une augmentation du ratio HAT/HDAC. Ces résultats sont observés en condition aiguë et en condition répétée.

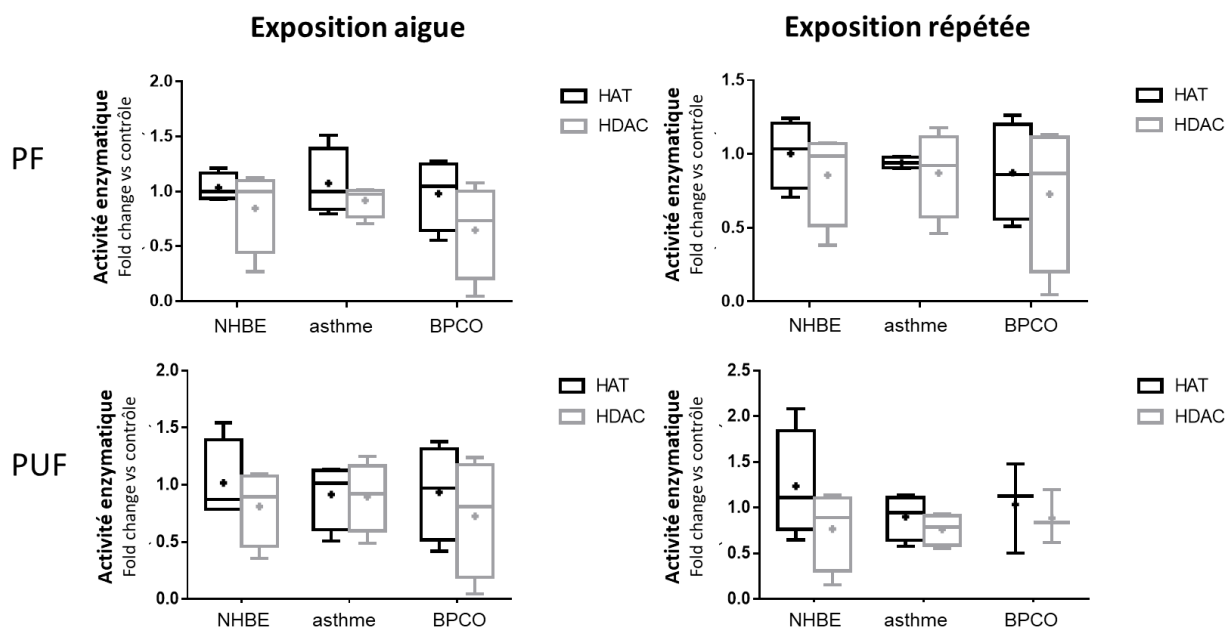


Figure 50 : Activité enzymatique des Histone AcétylTransférases (HAT) et des Histone Désacétylases (HDAC). Pour chaque condition, les graphes montrent la moyenne, représentée par un trait et la médiane, représentée par un point, de mêmes que les valeurs minimales et maximales et les 25^{ème} et 75^{ème} percentiles

L'expression des histones 3 acétylés (H3K9) et des histones 3 totaux a été mesurée par western blot. Les résultats montrent une tendance à l'acétylation des H3 suivant l'exposition répétée aux PF, et particulièrement aux PUF sur les cellules de phénotype pathologique. En condition aiguë cette tendance est observée uniquement dans le groupe des DHBE-BPCO. Dans leur ensemble, ces résultats supposent que les deux fractions de particules induisent une légère diminution de l'activité HDAC, résultant en l'acétylation des histones H3K9. Toutefois, une variabilité relativement importante a été observée dans chaque groupe et les tendances décrites ne sont pas statistiquement significatives.

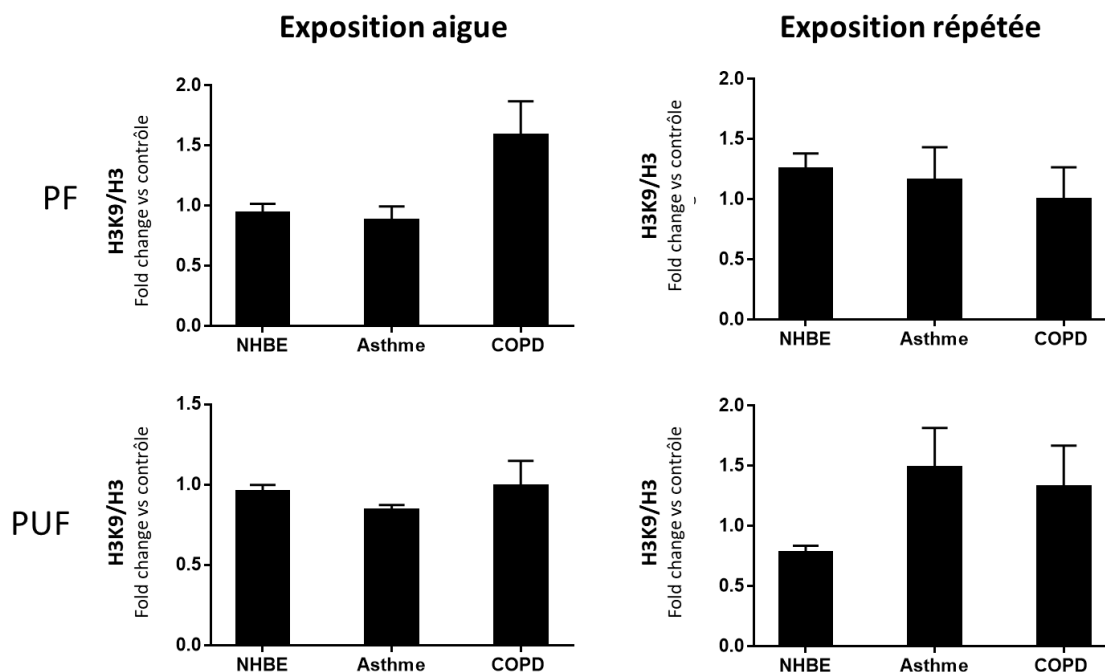


Figure 51 : Acétylation des histones H3 en lysine 9 (K9), les résultats sont exprimés sous forme de rapport entre la forme acétylée (H3K9) et la forme totale (H3). Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- SEM

1.5. Génotoxicité

La génotoxicité a été évaluée sur les cellules du groupe NHBE et sur deux types de lignées cellulaires épithéliales bronchiques : la lignée non cancéreuse BEAS-2B et la lignée NCI-H292, dérivée d'un carcinome mucoépidermoïde. Le test des comètes a été utilisé pour analyser la dégradation de l'ADN par quantification des fragments d'ADN induits par cassure double brin. Le Methyl MethaneSulphonate (MMS), un agent alkylant connu pour ses propriétés génotoxiques a été utilisé comme contrôle positif. Les lignées cellulaires présentent une sensibilité accrue par rapport aux cellules primaires sur la base de ce test. Après 4h d'exposition aux PF, les lignées BEAS-2B et NCI-H292 présentent une dégradation de l'ADN significative. L'exposition aux PUF induit une dégradation significative sur les cellules BEAS-2B, et une tendance sur les cellules NCI-H292. Aucune tendance n'a été observée sur les NHBE (Figure 52).

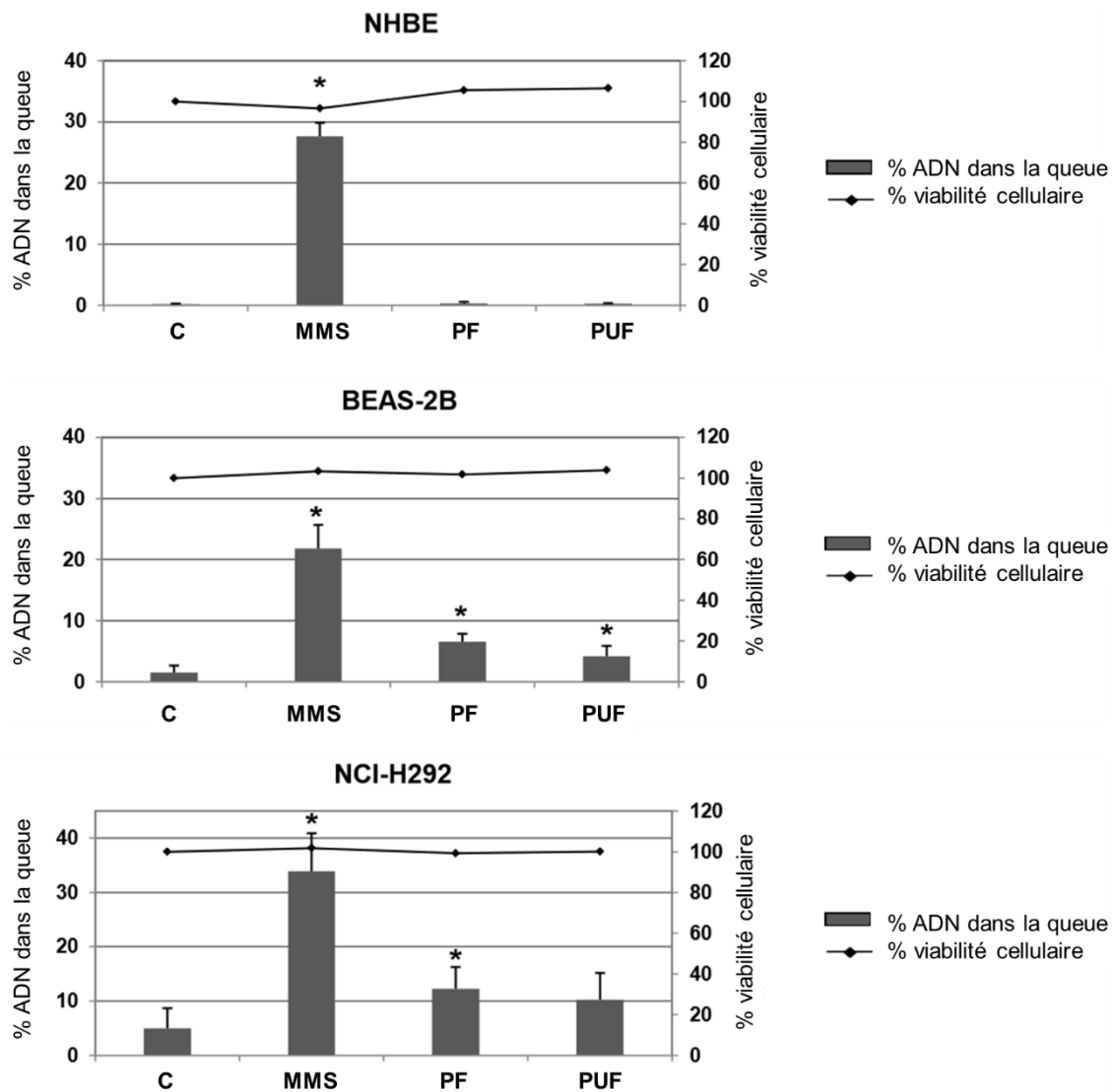


Figure 52 : Fragmentation de l'ADN évaluée par le test des comètes. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- écart type, n=4, Mann-Whitney U-test, *p < 0,05 : seuil de significativité par rapport aux contrôle (C)

Le test de micronoyaux a été utilisé pour évaluer les aberrations mitotiques survenant au cours de divisions cellulaires successives. Ces aberrations se traduisent par la présence d'un micronoyau supplémentaire dans la cellule. Aucune variation significative n'a été observée sur le nombre de cellules comportant des micronoyaux après exposition aux PF ou aux PUF. Une légère tendance est toutefois observée sur les NHBE (Figure 53). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée en annexes.

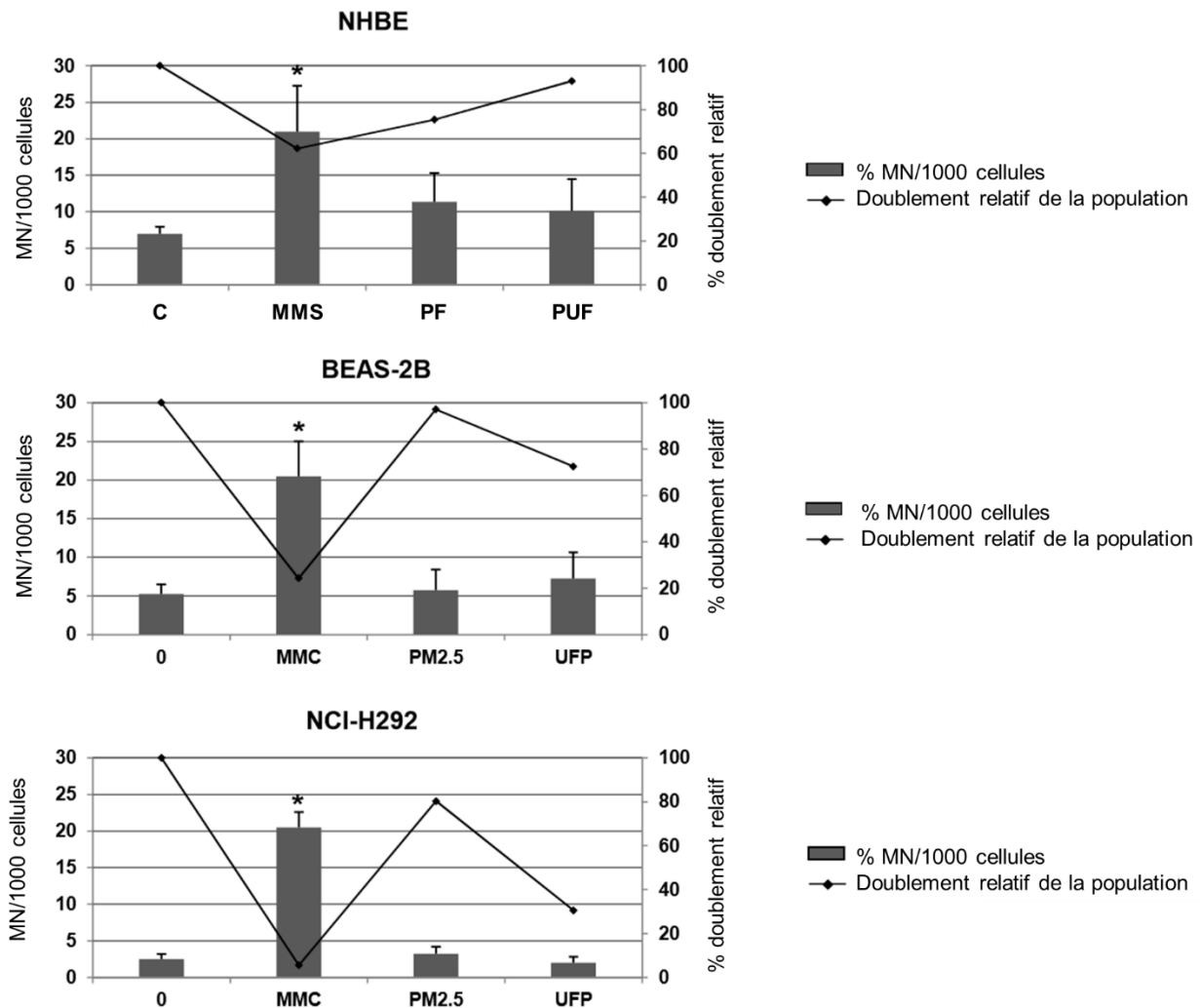


Figure 53 : Aberrations mitotiques évaluées par le test des micronoyaux. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne +/- écart type, n=4, test du Chi², *p < 0,05 : seuil de significativité par rapport au contrôle

1.6. Profils d'expression génique

Pour caractériser les phénotypes cellulaires, les Gènes Exprimés Différentiellement (GED) entre les NHBE et les DHBE-asthme et BPCO ont d'abord été analysés à l'état basal. 35 GED (i.e. 16 amplifiés et 19 réprimés) ont été détectés dans les contrôles des DHBE-asthme (Tableau 10), et 23 GED (i.e. 11 amplifiés et 12 réprimés) dans les contrôles des DHBE-BPCO par rapport aux contrôles des NHBE (Tableau 11).

Tableau 10 : Gènes exprimés différemment entre les NHBE et les DHBE-Asthme à l'état basal

Gène	Fold change	p value
WDR66	6,19	8,20E-03
RAP1GAP2	4,62	4,05E-03
Inc-SLC15A4-12	3,96	1,56E-03
PLA2G4C	3,86	2,43E-04
NLRP1	3,43	3,62E-03
ABLIM3	3,37	3,94E-03
HCLS1	3,31	2,49E-03
PODXL	3,22	3,08E-03
MANSC1	3,01	2,65E-03
GAD1	3,01	3,35E-03
PDE4DIP	2,39	8,84E-03
DUSP7	2,35	5,30E-03
APBA1	2,24	7,80E-03
PATL1	2,11	1,03E-03
TBC1D5	1,79	7,11E-03
TLE3	1,76	7,49E-03
Inc-ARFGEF2-2	-1,87	4,86E-03
ZMIZ1-AS1	-1,97	3,60E-03
LOC339803	-2,03	6,49E-03
XLOC_I2_004706	-2,15	8,58E-03
TRPC2	-2,17	9,50E-03
HLA-DRB3	-2,19	9,99E-03
Inc-OXNAD1-1	-2,31	7,95E-03
Inc-CNOT6-1	-2,38	7,26E-03
TMEM130	-2,58	9,35E-03
LOC101059954	-2,60	6,58E-03
Inc-STX18-1	-2,93	1,63E-03
VSIG10	-3,20	7,35E-03
TRPM5	-3,34	3,55E-03
HLA-DMB	-3,60	3,17E-03
LINC01535	-3,66	9,99E-03
Inc-INO80C-1	-3,71	1,24E-03
C1orf140	-3,78	9,35E-03
S100A5	-3,98	9,77E-03
WNT10B	-4,63	3,39E-03
LOC100506274	-4,96	3,62E-03
Inc-MRPS33-1	-6,35	2,64E-03

Tableau 11 : Gènes exprimés différemment entre les NHBE et les DHBE-BPCO à l'état basal

Gène	Fold change	p value
CYP4X1	4,24	2,32E-03
XLOC_I2_013730	4,01	8,80E-03
MUC1	3,68	7,74E-03
SLC15A2	3,51	3,07E-03
RAB37	2,87	3,70E-03
LOC102724384	2,63	2,21E-03
EDIL3	2,54	8,98E-04
ASB16	2,35	2,92E-03
APOL4	1,90	8,77E-03
PTEN	1,80	7,81E-03
ATXN10	1,76	8,18E-03
CCNE1	-1,74	8,57E-03
PPM1K	-1,95	7,38E-03
PHYHIP	-2,06	9,09E-03
DNHD1	-2,33	2,43E-03
LOC100130938	-2,42	6,87E-03
NKD2	-2,95	6,81E-03
HIP1R	-3,07	1,77E-03
KCNN2	-4,59	1,59E-03
MARCO	-4,90	6,20E-03
KRT34	-5,31	8,36E-03
COL6A1	-7,95	1,23E-03
COL6A2	-8,72	5,83E-03

Les profils d'expression génique des NHBE ou des DHBE-asthme ou des DHBE-BPCO exposés aux particules ont ensuite été comparés à leurs contrôles respectifs (HBSS). L'exposition aux PF et aux PUF a induit des profils quasi-similaires, avec des Fold Changes (FC) généralement plus importants en valeur absolue avec les PUF. De ce fait, nous avons choisi de centrer l'analyse sur les GED induits par l'exposition aux PUF (cf. article pour la liste de gène complète). Dans le groupe des NHBE, 32 (23 amplifiés et 9 réprimés) et 57 (39 amplifiés et 18 réprimés) GED ont été détectés respectivement après exposition aiguë et répétée (Tableau 12). Dans le groupe des DHBE-asthme, il y a eu respectivement 56 (45 amplifiés et 11 réprimés) et 43 (27 amplifiés et 16 réprimés) DEG (Tableau 13), et 73 (62 amplifiés et 11 réprimés) et 67 (52 amplifiés et 15 réprimés) dans le groupe des DHBE-BPCO (Tableau 14). Alors que le nombre de GED est plus important dans les DHBE-asthme et particulièrement dans les DHBE-BPCO après exposition aiguë, cette différence tend à diminuer avec une exposition répétée.

L'ensemble des gènes dérégulés par une exposition aiguë ou répétée, aux PF ou aux PUF, ainsi que les voies de signalisation et les top networks identifiés dans chaque groupe sont disponibles au format .XLS dans les supplemental data de l'article.

Tableau 12 : Top 30 des gènes exprimés différemment (20 amplifiés, 10 réprimés) dans le groupe des NHBE après exposition aux PUF

Exposition aiguë			Exposition répétée		
Gène	Fold change	p value	Gène	Fold change	p value
CYP1A1	32,11	1,08E-06	CYP1A1	34,22	7,58E-07
NPTX1	10,97	8,23E-04	ALDH3A1	11,51	1,65E-03
CYP1B1	6,31	8,69E-07	CYP1A2	7,65	1,20E-04
SLC7A5	4,77	3,08E-04	CYP1B1	5,88	1,85E-08
ENTPD8	4,66	1,71E-03	EPGN	5,24	3,49E-03
GPER1	4,29	8,84E-04	MYZAP	4,38	4,03E-04
ROR1	4,23	9,02E-04	VIPR1	4,31	3,83E-03
DLX2	3,85	2,74E-04	BCAS2	4,22	4,45E-03
NKAIN1	3,38	2,94E-03	LOC344887	3,81	3,95E-03
COX10	3,11	6,26E-03	NQO1	3,59	7,30E-03
CYSRT1	3,09	8,37E-04	ARHGEF2	3,24	4,14E-03
MFNG	2,40	2,77E-03	CRHR1-IT1	3,20	4,36E-03
LOC284072	2,30	4,78E-03	CYSRT1	3,18	4,78E-04
ZNF799	2,11	2,66E-03	GPR110	2,90	8,75E-03
ATF6B	2,10	3,39E-03	RBM23	2,72	5,23E-03
KCTD18	1,90	9,88E-04	LINC00886	2,69	1,43E-03
SRR	1,87	4,98E-04	C11orf91	2,60	3,17E-03
EDC3	1,86	1,28E-03	TMEM156	2,50	6,21E-04
LINC00673	1,77	9,22E-03	DHX30	2,44	4,66E-03
PHTF1	1,76	7,12E-03	MFNG	2,43	2,42E-03
TMEM64	-1,68	4,27E-03	FAM120C	-1,98	7,61E-03
LOC100131831	-1,91	9,34E-03	KITLG	-2,02	4,44E-03
TET2	-2,06	5,45E-03	LOC100131831	-2,02	4,82E-03
ZNF552	-2,19	1,00E-03	GPR155	-2,06	6,74E-03
BMP2K	-2,24	5,58E-03	PER2	-2,16	2,33E-03
NHLRC3	-2,43	9,78E-03	LRIG3	-2,36	4,00E-03
KCTD19	-2,44	6,55E-03	Inc-CRISP2-1	-2,43	1,52E-03
LOC100507520	-2,58	7,77E-03	C2orf50	-2,48	9,54E-03
HLA-DOA	-2,85	7,18E-03	BOLA3-AS1	-3,60	8,80E-03
			SLC1A3	-4,89	1,01E-05

Tableau 13 : Top 30 des gènes exprimés différemment (20 amplifiés, 10 réprimés) dans le groupe des DHBE-asthme après exposition aux PUF

Exposition aiguë			Exposition répétée		
Gène	Fold change	p value	Gène	Fold change	p value
CYP1A1	27,54	9,77E-07	CYP1A1	26,49	4,67E-08
NPTX1	11,38	3,92E-04	ALDH3A1	6,75	1,23E-06
ENTPD8	7,48	3,44E-05	SLC16A6	5,59	3,07E-06
EPGN	6,12	9,18E-04	RAB37	5,25	1,00E-04
F2RL3	5,76	3,02E-03	CYP1B1	5,15	3,24E-04
SLC16A6	5,56	8,16E-04	ENTPD8	4,90	7,31E-04
CYP1B1	5,41	1,77E-06	UNC13C	4,81	7,83E-04
NKAIN1	4,88	8,64E-05	EPGN	4,80	8,63E-04
UNC13C	4,81	6,22E-03	CYP1A2	4,13	9,27E-04
STC2	4,52	5,43E-03	XLOC_I2_011627	3,60	9,82E-04
SLC7A5	4,13	5,24E-04	LINC00880	3,51	1,18E-03
CHDH	3,93	9,14E-03	SLC7A5	3,25	1,43E-03
GPER1	3,76	1,04E-03	LINC00886	3,24	1,86E-03
XLOC_I2_011627	3,74	6,75E-04	GPR110	3,02	2,17E-03
LOC100128317	3,47	4,29E-03	EREG	2,80	3,23E-03
ROR1	3,03	6,19E-03	CYSRT1	2,72	3,35E-03
DLX2	2,95	1,74E-03	ACOXL	2,45	3,53E-03
LINC00880	2,84	5,35E-03	MFNG	2,35	3,63E-03
FAM167A	2,83	3,03E-03	TIPARP	2,22	3,91E-03
RPS6KA5	2,66	6,71E-03	Inc-SLC44A5-4	2,22	3,93E-03
TRPS1	-1,55	5,98E-03	FAM46A	-1,71	8,41E-03
CITED2	-1,57	1,98E-03	SERTAD4	-1,78	8,59E-03
HERC2	-1,57	8,80E-03	PDE5A	-1,78	8,66E-03
TIGD2	-1,62	1,11E-04	ALDH1B1	-1,80	8,84E-03
RIN2	-1,70	1,89E-03	ATP1A1-AS1	-1,87	8,88E-03
TRAK1	-2,08	4,99E-03	KITLG	-1,95	9,41E-03
Inc-C16orf55-1	-2,30	8,34E-03	HEY1	-2,29	9,64E-03
SERTAD4	-2,32	2,16E-04	CTGF	-2,66	9,73E-03
FAM84A	-2,45	3,30E-03	FGF1	-4,78	9,87E-03
CASC10	-2,83	2,00E-03	CNIH3	-5,03	9,92E-03

Tableau 14 : Top 30 des gènes exprimés différentiellement (20 amplifiés, 10 réprimés) dans le groupe des DHBE-BPCO après exposition aux PUF

Exposition aiguë			Exposition répétée		
Gène	Fold change	Gène	GeneSymbol	Fold change	p value
CYP1A1	98,13	1,91E-09	CYP1A1	103,02	1,45E-09
IL24	7,88	2,53E-09	CYP1B1	7,32	2,53E-09
NPTX1	7,84	1,46E-07	ZNF644	7,15	1,76E-07
CYP1B1	7,44	3,42E-06	CYP1A2	6,31	3,54E-05
C5AR2	6,42	1,47E-04	SCL45A4	5,15	1,35E-04
CYP1A2	5,41	2,31E-04	ENTPD8	4,72	3,39E-04
ENTPD8	4,74	2,48E-04	SNHG11	4,14	3,45E-04
VIPR1	4,59	3,30E-04	VIPR1	4,03	3,81E-04
E2F7	4,53	4,88E-04	FGR	3,64	4,21E-04
SLC7A5	4,24	5,76E-04	EREG	3,24	4,64E-04
WNT7B	4,12	6,06E-04	WNT7B	3,22	5,10E-04
ROR1	4,01	6,28E-04	ACOXL	3,14	8,07E-04
HILS1	3,82	7,51E-04	LOC344887	3,04	1,02E-03
GPER1	3,40	9,23E-04	LOC284072	2,85	1,06E-03
DEF6	3,34	9,76E-04	LINC00886	2,73	1,10E-03
FGR	3,12	1,05E-03	C2CD3	2,72	1,10E-03
LOC284072	3,12	1,09E-03	TIPARP	2,50	1,12E-03
ACOXL	3,10	1,23E-03	CYSRT1	2,50	1,21E-03
GPR157	2,93	1,54E-03	ANKRD42	2,45	1,25E-03
Inc-SLC15A4-12	2,87	1,57E-03	Inc-GPR55-2	2,43	1,59E-03
TIGD2	-1,40	8,23E-03	KITLG	-2,05	8,36E-03
CITED2	-1,59	8,45E-03	ID3	-2,11	8,58E-03
NR2F2	-1,59	8,50E-03	LINC00313	-2,22	8,76E-03
Inc-DNAI1-1	-1,87	8,82E-03	Inc-DMRT2-1	-2,38	8,81E-03
ZDHHC8	-1,87	8,83E-03	FAM171A2	-2,71	8,83E-03
SUMO2	-2,04	9,01E-03	SENCR	-2,75	8,91E-03
FAM13A	-2,21	9,10E-03	LFNG	-3,04	9,02E-03
ZSCAN1	-2,41	9,28E-03	MYLK	-3,10	9,14E-03
TMPRSS7	-2,42	9,93E-03	PPARGC1A	-4,81	9,75E-03
REG1P	-2,83	9,97E-03	FGF1	-5,36	9,96E-03

Comme le montre la Figure 54, respectivement 9 GED (i.e. cytochrome P4501A1 (CYP1A1), neuronal pentraxin 1 (NPTX1), cytochrome P4501B1 (CYP1B1), Solute Carrier Family 7 Member 5 (SLC7A5), Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 8 (ENTPD8), G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER1), Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 (ROR1), Enhancer of mRNA-decapping protein 3 (EDC3), Transmembrane Protein 138 (TMEM138)) et 10 GED (i.e. CYP1A1, cytochrome P4501A2 (CYP1A2, CYP1B1, Cysteine Rich Tail (CYSRT1), Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 886 (LINC00886), Transmembrane Protein 156 (TMEM156), MFNG O-Fucosylpeptide 3-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase

(MFNG), Epiregulin (EREG), Enhancer Of MRNA Decapping 3 (EDC3), KIT Ligand (KITLG) sont communs aux trois groupes étudiés après exposition aiguë et répétée.

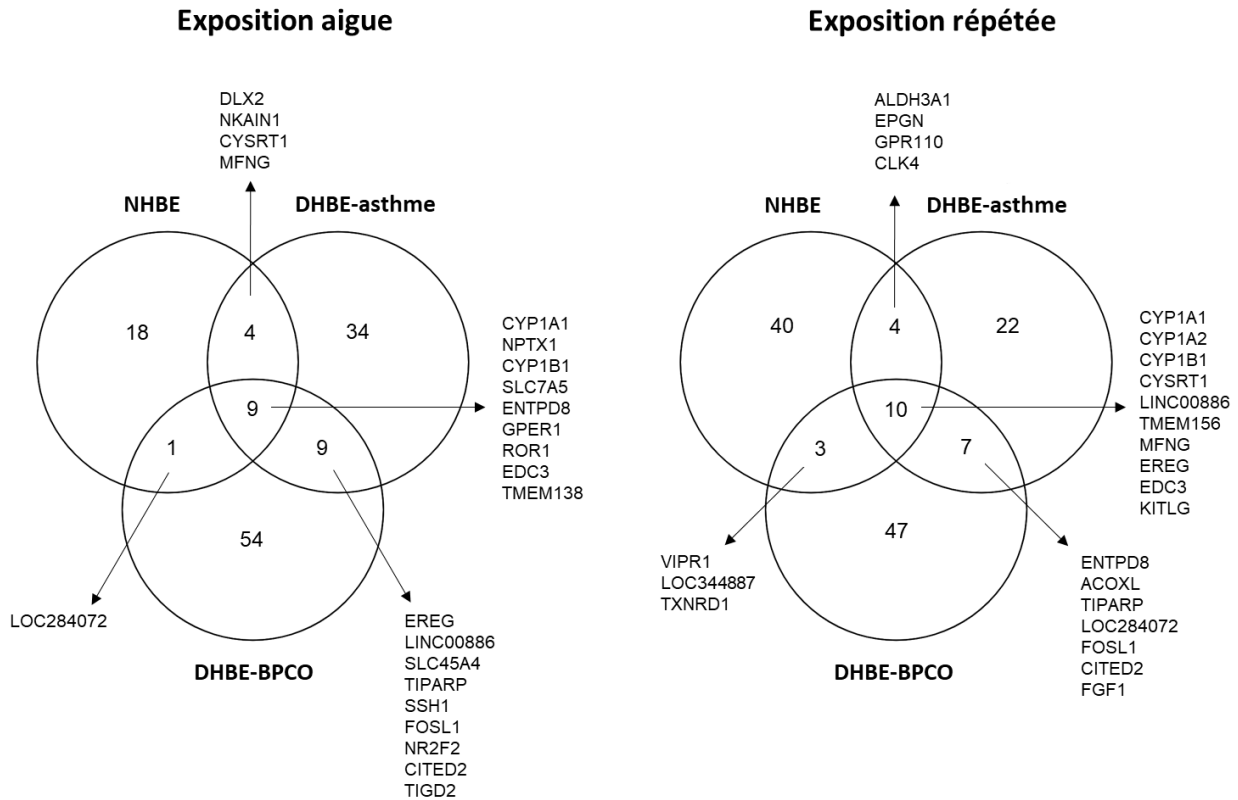


Figure 54 : Diagramme de Venn représentant les modifications communes et spécifiques de l'expression des gènes dans les NHBE, DHBE-asthme et DHBE-BPCO exposés aux PUF.

En outre, respectivement 9 GED (i.e. EREG, LINC00886, Solute Carrier Family 45 Member 4 (SLC45A4), TCDD Inducible Poly ADP-Ribose Polymerase (TIPARP), Slingshot Protein Phosphatase 1 (SSH1), FOS Like 1, AP-1 Transcription Factor Subunit (FOSL1), Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 2 (NRF2F2), Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 2 (CITED2), Tigger Transposable Element Derived 2 (TIGD2) et 7 GED (ENTPD8, AcylCoA Oxidase Like (ACOXL), TIPARP, LOC284072, SLC45A4, FOSL1, CITED2, Fibroblast Growth factor 1 (FGF1)) sont communs aux DHBE-asthme et DHBE-BPCO après exposition aiguë et répétée. L'analyse ontologique des gènes a été utilisée pour identifier les principales fonctions moléculaires des GED, et les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués. Comme le montre la Figure 55, l'exposition aux PUF a induit des patterns d'expression génique relativement similaires entre les trois

groupes analysés. D'une manière générale la majorité des GED sont impliqués dans des processus cellulaires, incluant le cycle cellulaire et la communication cellulaire, et dans le métabolisme.

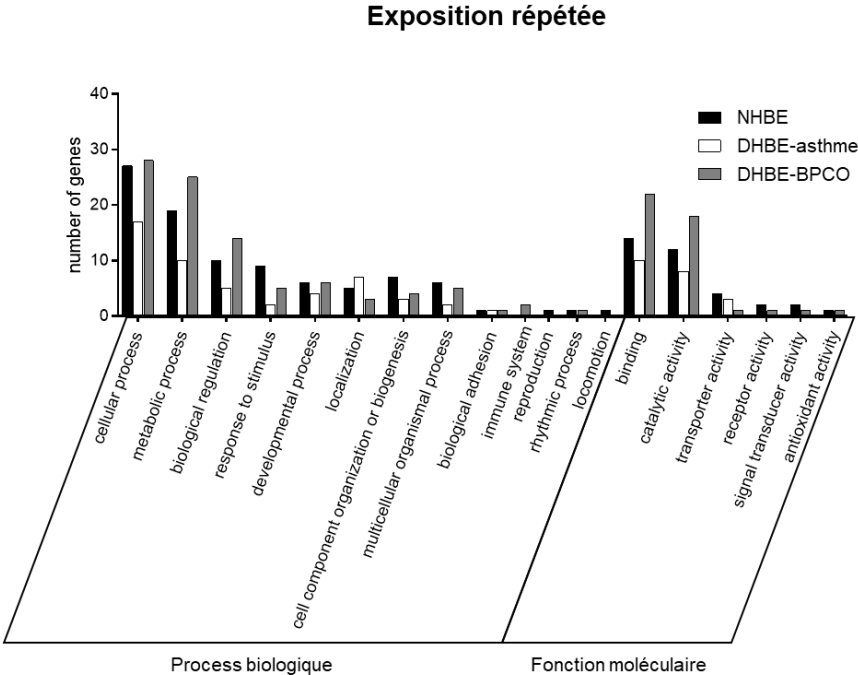
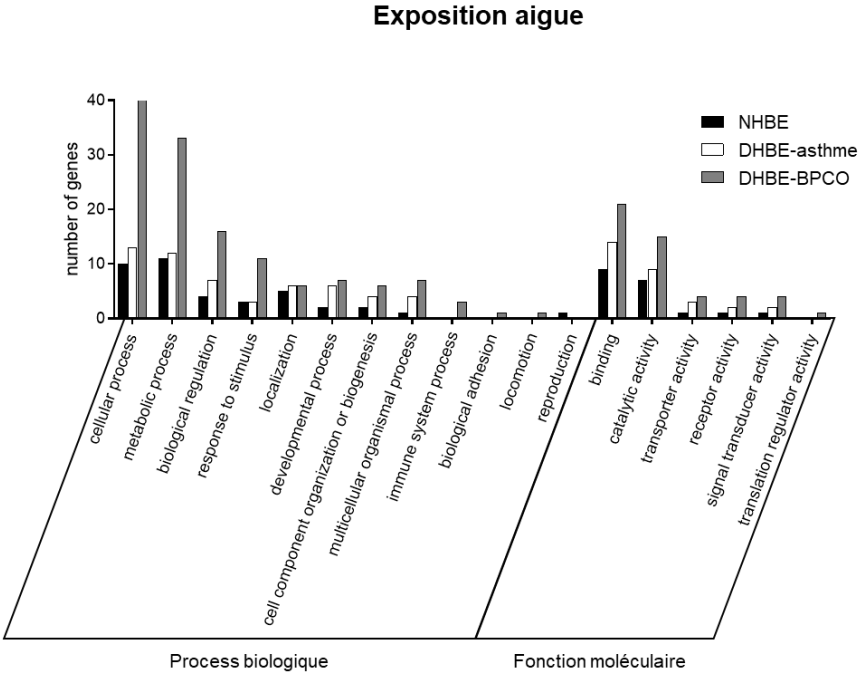


Figure 55 : Processus biologiques et fonctions moléculaires des GED

Avec une exposition aiguë, le nombre de GED impliqués dans ces processus est plus important dans le groupe des DHBE-BPCO, et certains processus (e.g.

immune system, biological adhesion, locomotion) sont activés uniquement dans le groupe des DHBE-COPD.

Les voies de signalisations induites significativement en commun dans les trois groupes sont associées aux processus de métabolisation et liées à l'activation de l'Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) : Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (hsa_00980), Tryptophan metabolism (hsa_00380), Chemical carcinogenesis (hsa_05204), Steroid hormone biosynthesis (hsa_00140). La voie RNA degradation pathway (hsa_03018) a été spécifiquement dérégulée dans le groupe des NHBE avec l'exposition répétée, les voies Rap1 signaling pathway (hsa_04015), Regulation of actin cytoskeleton (hsa_04810) et adipocytokine signaling pathway (hsa_04920) ont été spécifiquement dérégulées dans le groupe des DHBE-BPCO après exposition aiguë et répétée. Le système de classification des réseaux de gènes du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) a été utilisé pour identifier des clusters de gènes en fonction de leurs interconnexions (interactions). Malgré certaines différences observées entre les modèles cellulaires (NHBE, DHBE-asthme, DHBE-BPCO) et les stratégies d'expositions (aiguë et répétée), les principaux clusters sont généralement associés à la survie, au cycle cellulaire, ainsi qu'au mouvement et à la prolifération cellulaire (cf. article pour les top networks).

1.7. Discussion

1.7.1. Modèles *in vitro* et protocole d'exposition

De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation de la prévalence des symptômes respiratoires causée par une exposition à la pollution de l'air à court terme [133,134,136], et à long terme [144,147–149]. Devant ce constat, des études toxicologiques sont nécessaires pour comprendre les mécanismes physiopathologiques en cause, notamment dans l'initiation et l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques. A ce jour, peu de données sont disponibles sur la toxicité des PUF, potentiellement plus réactives, et leur contribution aux effets sanitaires rapportés des particules fines PF. Pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques dans cette étude, des modèles d'épithélia bronchiques humains dérivés de primocultures ont été développés *in vitro*. Afin d'intégrer la sensibilité particulière liée à un état pathologique sous-jacent, les cellules bronchiques utilisées provenaient de donneurs sains, de donneurs asthmatiques et de donneurs atteints de BPCO. La différenciation des cellules à l'interface air liquide durant 28 jours a permis de reconstituer des tapis cellulaires en 3D présentant de nombreuses similitudes avec l'épithélium bronchique humain *in vivo* [168]. En effet, la caractérisation des cellules a permis de valider l'expression des jonctions serrées, et d'un phénotype mucociliaire caractéristique de l'épithélium bronchique. Il est à noter que les études actuelles utilisent principalement des lignées cellulaires (e.g. BEAS-2B, A549, NCI-H292) pour étudier les effets toxicologiques pulmonaires des polluants de l'air. Malgré de nombreux avantages liés à leur disponibilité et leurs faibles exigences de culture, les lignées cellulaires sont moins représentatives de la réalité physiologique. A ce jour, peu d'étude ont utilisé des primocultures différenciées pour étudier les effets des PF et/ou des PUF. Les modèles d'épithélia ont été traités avec 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de particules administrées en solution aqueuse sur le pôle apical. Cette dose a été sélectionnée sur la base d'essais préliminaires et de résultats précédemment publiés [188,192,204,225]. Elle figure parmi les plus faibles rapportées dans la littérature, pouvant induire des effets biologiques *in vitro* [188,192,194,196,204,207,225,238,239,246]. Par ailleurs, Li et al. [187] ont estimé par un calcul dosimétrique qu'une dose de 2,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$ de $\text{PM}_{2.5}$ pouvait être déposée dans la région trachéobronchique, avec une concentration ambiante de 79 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de

PM. Une limite doit toutefois être prise en considération concernant la méthode d'exposition. En effet, les particules sont administrées dans une solution saline (HBSS) pouvant modifier certaines de leurs caractéristiques, telles que leur morphologie, leur chimie de surface et leur taux d'agrégation [247], ainsi que la solubilité et la biodisponibilité de certains métaux [248]. Il pourrait être intéressant d'utiliser un système permettant d'administrer directement les particules sur le pôle apical des cellules sans impliquer leur dilution en phase liquide. Il existe des systèmes de génération d'aérosols (e.g. INVITROCELL®) permettant toutefois un moins bon contrôle de la dose effectivement déposée et nécessitant une quantité plus importante de particules pour compenser les pertes [249]. Le protocole d'exposition répété a permis de simuler une exposition cumulative, avec un temps de récupération entre chaque traitement, et d'obtenir une réponse biologique accentuée par rapport à l'exposition aiguë tout en conservant une faible dose.

1.7.2. Sécrétion de médiateurs inflammatoires

L'asthme et la BPCO sont des pathologies toutes deux caractérisées par une inflammation pulmonaire chronique, bien que la nature et les sites d'inflammation soient différents [60,86,87]. Par conséquent, une quantité de cytokines plus importante est généralement observée dans les tissus pulmonaires et les sécrétions de personnes atteintes d'une de ces pathologies. De manière surprenante, aucune différence significative n'a été constatée sur la sécrétion basale de cytokines entre les NHBE et les DHBE. En revanche, une sensibilité accrue des DHBE a été observée après le traitement aux particules. En effet, alors qu'une exposition aux PF ou aux PUF ne modifie pas la sécrétion de cytokine des NHBE, les DHBE ont déclenché une réaction inflammatoire à la même dose, avec notamment une réponse plus importante dans le groupe des DHBE-BPCO que dans le groupe des DHBE-Asthme. De manière similaire, une étude utilisant des modèles d'épithélia différenciés de phénotypes « sains » et asthmatiques a montré une sécrétion de cytokine accentuée (IL-6, IL-8 et GM-CSF) sur les modèles asthmatiques après une exposition à des PM, sans observer de différences à l'état basal sur la sécrétion des cytokines analysées (IL-6, IL-8, GM-CSF et IL-13) [250]. Dans une autre étude, une sensibilité intrinsèque plus importante de l'épithélium asthmatique vs sain a aussi été mise en évidence par une réponse

inflammatoire plus importante (IL-1 β , IL-6, IL-13, TGF β) et une régénération moins efficace après lésion, malgré une sécrétion de cytokine et des indices mitotiques similaires à l'état basal [251]. A l'inverse, Leclercq et al. ont observé une sécrétion basale plus importante de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , IL-8, GM-CSF) dans des DHBE-COPD différenciées par rapports à des NHBE différenciées [188]. Toutefois cette dernière étude n'intégrait pas la variabilité provenant de différents donneurs. Dans notre étude, les cytokines analysées ont été choisies pour leur rôle pro-inflammatoire démontré dans les pathologies broncho-pulmonaires, pour comparer la sensibilité des différents modèles. Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement les cytokines de profil TH2 (e.g. IL4, IL5, IL9, IL13), compte tenu de la physiopathologie de certaines formes d'asthme. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une exacerbation de l'asthme médiée en partie par une réaction allergique ou du moins par une inflammation de type TH2. Il est à noter dans nos résultats que la sécrétion cytokinique des DHBE était généralement plus importante avec une exposition aux PUF qu'avec une exposition aux PF. En outre, la sécrétion accentuée de certaines cytokines est induite seulement avec un traitement répété aux PF, alors que les PUF induisent leur sécrétion avec un traitement aigu et répété (e.g. IL-1 β , TGF α). La composition chimique relativement similaire observée entre les PF et les PUF suggère que la plus forte toxicité observée pour les PUF dans notre étude provient principalement de leur plus grande surface spécifique et de leur nombre plus important par unité de masse. L'ensemble de ces observations suggèrent d'une part une susceptibilité accrue des cellules provenant de donneurs atteints d'une BPC à la pollution atmosphérique, et deuxièmement, une part importante des PUF dans les effets toxiques rapportés des PF. Toutefois, une limite majeure à prendre en compte dans cette étude est le nombre relativement restreint d'individus par groupes (n = 4), compte tenu de l'hétérogénéité des caractéristiques des patients (âges, traitements, historique du tabagisme pour les patients BPCO, ...), et de la diversité phénotypique qui caractérise l'asthme et la BPCO.

1.7.3. Modifications des histones

Malgré une variabilité de réponse assez importante, l'exposition aux PF et aux PUF a induit une tendance à la diminution de l'activité histone désacétylase (HDAC)

dans chaque groupe, entraînant une tendance à l'acétylation H3K9 dans les cellules de phénotype pathologique (observée après un traitement répété aux PUF). La stratégie d'exposition aiguë ou répétée ne semble pas avoir d'influence sur les résultats. Plusieurs études ont montré qu'une exposition aux PM pouvait induire une modification de la balance entre l'activité des histones acétyltransférases (HAT) et les HDAC, résultant en l'acétylation des histones H3 (H3K9, H3K27) [225,234–237,252] et des histones H4 [239]. En outre, ces modifications de la balance HAT/HDAC en faveur d'une acétylation plus importante des histones sont retrouvées dans les tissus pulmonaires de patients atteints d'asthme [232] de BPCO [75,83], [233]. La balance HAT/HDAC, et le niveau d'acétylation des histones qui en résulte régule la transcription de gènes pouvant être impliqués dans plusieurs aspects de la réaction inflammatoire tels que la prolifération cellulaire, l'activation des cellules immunitaires et la sécrétion de cytokines [237–239]. Ces modifications durables peuvent ainsi contribuer à maintenir la réaction inflammatoire pulmonaire chronique. L'inhibition de l'activité HDAC retrouvée dans certaines formes d'asthme et dans la BPCO pourrait d'ailleurs expliquer la résistance aux traitements par corticoïdes observée dans ces pathologies [83,84]. En somme, les modifications épigénétiques, et notamment les modifications d'histones, pourraient constituer un lien important entre l'exposition à la pollution de l'air et l'initiation ou l'aggravation de bronchopneumopathies chroniques.

1.7.4. Génotoxicité

La génotoxicité des PF et des PUF à 5 µg/cm² a été évaluée sur les NHBE et sur deux types de lignées cellulaires épithéliales bronchiques (BEAS-2B et NCI-H292). Le test des comètes et le test des micronoyaux ont été choisis pour leur complémentarité dans la détection de lésions primaires de l'ADN et d'aberrations chromosomiques respectivement. Des résultats négatifs ont été obtenus pour ces deux tests sur les NHBE. En revanche, l'exposition aux particules a induit des lésions primaires de l'ADN montrées par le test des comètes sur les deux modèles de lignées cellulaires et une réponse négative pour le test des micronoyaux. Le fait que les lésions de l'ADN n'aient pas induites d'aberrations chromosomiques dans les lignées cellulaires suggère la potentielle mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN. Les lignées BEAS-2B et NCI-H292 figurent parmi les lignées cellulaires pulmonaires classiquement

utilisées qui présentent la plus grande homologie avec les cellules primaires en terme de capacités métaboliques (enzymes du métabolisme des xénobiotiques, transporteurs et récepteurs nucléaires) [165]. Toutefois, leurs capacités détoxifiantes (système antioxydant) et de réparation de l'ADN amoindries pourraient rendre ces modèles plus susceptibles de développer des lésions primaires de l'ADN. Les lignées cellulaires ont aussi une fonction de barrière épithéliale diminuée par rapport aux cellules primaires et sont relativement inefficaces quant à la formation de jonctions serrées [166].

1.7.5. Analyse pangénomique

La dérégulation de l'expression génique a été évaluée par la technique de microarray, avec pour objectif d'identifier les gènes et les voies de signalisation induites par une exposition aux PM dans les cellules de phénotypes sain et pathologique.

1.7.5.1. *Profils transcriptomiques à l'état basal*

Pour caractériser les phénotypes cellulaires asthmatique et BPCO, les gènes exprimés différemment (GED) entre les DHBE (asthme et BPCO) et les NHBE ont d'abord été analysés à l'état basal. 23 gènes étaient dérégulés dans le groupe des DHBE-BPCO comparé au groupe des NHBE. Parmi ceux-ci, 4 gènes (CCNE1↓, PTEN↑, COL6A1↓, COL6A2↓), sont impliqués dans la voie PI3/AkT selon la base de donnée KEGG 2016 pathway. L'expression de COL6A1 et COL6A2 était fortement diminuée. Ces gènes codent tous les deux pour des protéines constituant des fibres de collagène VI, impliquées dans les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, et notamment l'adhésion de l'épithélium à la membrane basale. COL6 aurait un rôle important dans la réparation de l'épithélium en permettant l'étalement optimal des cellules au niveau des zones lésées [253]. Une étude a montré que des souris transgéniques *Col6a1^{-/-}* avaient une tolérance réduite à l'exercice et une perte d'élasticité alvéolaire [254]. Une expression augmentée du gène pro-angiogénique EGF like repeats and Discoidin domains 3 (EDIL3) a également été observée dans le groupe des DHBE-COPD. Plusieurs études ont montré que ce gène pouvait contribuer

à la transition épithélio-mésenchymateuse et au remodelage vasculaire observés dans la BPCO et les cancers du poumon [255–257]. L'expression accentuée du gène MUC-1, codant pour la surfactant protein mucin-1, dans le groupe des DHBE-BPCO a également été montrée dans les expectorations et les cellules épithéliales de patients atteints de BPCO [258] et d'adénocarcinome pulmonaire [259]. L'expression augmentée de cette mucine dans les tissus pathologiques pourrait constituer un marqueur de l'hypersécrétion de mucus, et témoigner d'un nombre plus important de cellules caliciformes que dans les tissus sains. Enfin, la diminution de l'expression du MACrophage Receptor with COLlagenous structure (MARCO) a aussi été observée dans les DHBE-BPCO. Une expression réduite de MARCO a été rapportée de manière dose-dépendante avec une exposition de macrophages à la fumée de cigarette [260]. ce phénomène pourrait contribuer à altérer l'efferocytose et la clairance bactérienne en inhibant la phagocytose des macrophages chez les sujets fumeurs [82,260].

35 gènes étaient significativement dérégulés dans le groupe des DHBE-asthme par rapport aux NHBE à l'état basal. Le gène PLA2G4C, codant pour la phospholipase A2 du groupe IVc, était celui dont l'expression était la plus augmentée. Les phospholipases A2 (PLA₂) ont un rôle clef dans l'induction de la réaction inflammatoire via la production d'acide arachidonique, un précurseur de médiateurs inflammatoires lipidiques de la famille des eicosanoïdes [261]. Une étude a montré une expression accentuée des PLA₂ (groupe X) dans les poumons de patients asthmatiques [262], et plusieurs études ont démontré l'implication des PLA₂ dans la pathogenèse de l'asthme [263–266]. Une étude s'intéressant spécifiquement à la PLA₂-IVc a montré qu'elle était impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages, et qu'elle induisait leur polarisation en macrophages M2 [267]. Les macrophages de type M2 sont habituellement induits par une réponse inflammatoire de type TH2 et pourraient jouer un rôle important dans l'asthme allergique [268–270]. Le NOD-like receptor family, Pyrin domain containing (NLRP1) est un gène impliqué dans l'activation de l'inflammasome, dont l'expression était positivement dérégulée comparé au groupe des NHBE. Toutefois, contrairement au NLRP3 qui est bien caractérisé, le rôle du NLRP1 dans l'immunité est à ce jour peu connu et aucune donnée n'a été trouvée sur son implication dans l'asthme. Le gène WNT10B était parmi les plus négativement dérégulés dans les DHBE-asthme par rapport aux NHBE. Il code pour la protéine du même nom (Wnt-10b), impliquée notamment dans la régulation de l'activation des

lymphocytes T, et de leur polarisation en lymphocytes TH2. En effet, l'inhibition de ce gène chez des souris (transgéniques *Wnt10b (-/-)*) augmente fortement le nombre d'éosinophiles, d'IL-4 et d'IL-13 dans les poumons [271] et joue donc un rôle important dans la régulation de l'inflammation pulmonaire de type TH2. De plus, 2 gènes (HLA-DMB et HLA-DRB3) codants pour des protéines du système HLA (Human Leukocyte Antigen), appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II), étaient négativement régulées par rapport aux NHBE. Les molécules du CMH II permettent aux cellules de présenter les antigènes des éléments extérieurs aux lymphocytes T pour initier la réponse immunitaire adaptative. L'inhibition combinée de ces deux gènes a également été montrée dans des macrophages exposés de manière répétée aux corticoïdes (propionate de fluticasone) et aux lipopolysaccharides [272]. En somme, malgré un nombre de gènes significativement dérégulés relativement faible, reflétant probablement la variabilité intragroupe, ces résultats permettent de discriminer les différents phénotypes cellulaires sur la base de gènes spécifiques.

1.7.5.2. Profils transcriptomiques après exposition aux PUF

Enfin, les gènes dérégulés après exposition aiguë ou répétée, aux PF ou aux PUF ont été analysés dans chaque groupe. Compte tenu de patterns d'expression génique relativement similaires obtenus avec l'exposition aux PF et aux PUF, nous avons choisi de concentrer l'analyse sur les GED induits par une exposition aux PUF. Le gène le plus induit dans chaque groupe, tant avec l'exposition aiguë et répétée était le CYP1A1 codant pour le cytochrome p450 du groupe 1A1. Cette protéine est impliquée dans la métabolisation des xénobiotiques associée avec l'activation de l'aryl hydrocarbon receptor (ahr). D'autres gènes inductibles par ahr [273,274] ont été positivement régulés en commun dans les trois groupes tels que CYP1B1, CYP1A2, SLC7A5, et NPTX1, codant pour la neuronal pentraxin 1, uniquement avec une exposition aiguë. Le TCDD Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase (TIPARP), un autre gène ahr-inductible a été activé uniquement dans les groupes DHBE-asthme et DHBE-BPCO après exposition aiguë et répétée. Enfin, certains gènes impliqués dans les processus de métabolisation ahr dépendants ont été spécifiquement dérégulés après une exposition répétée. C'est notamment le cas pour l'Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A1 (ALDH3A1) dérégulé dans les groupes NHBE et DHBE-asthme, l'UDP-

glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG) et la NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) dérégulées dans le groupe des NHBE, et ALDH1B1 dérégulée dans le groupe des DHBE-asthme. L'induction de la voie de métabolisation ahr semble être un des mécanismes les plus précoces pouvant intervenir en réponse à de faibles doses de PM [275,276]. Ce phénomène peut s'expliquer en partie par une quantité relativement importante d'HAP habituellement présente dans les PM, et mesurée dans nos échantillons. Par conséquent, les voies de signalisations communément dérégulées dans les 3 groupes étaient liées à l'activation de ces gènes ahr-inductibles (e.g. *Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450*, *Steroid hormone biosynthesis*, *Chemical carcinogenesis*) (cf. article pour les voies de signalisation dérégulées). Une récente étude a démontré que la sécrétion d'IL-24 était dépendante de l'activation d'ahr par les toxiques environnementaux [277]. De manière intéressante, IL-24 était l'un des gènes les plus fortement induits dans le groupe des DHBE-BPCO avec une exposition aiguë aux PF et aux PUF, alors qu'il ne semblait pas induit avec un protocole d'exposition répété. Un autre GED, ENTPD8 codant pour l'ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8, a été induit par les PF et les PUF dans les 3 groupes avec une exposition aiguë, et uniquement dans les groupes DHBE avec une exposition répétée. Une expression augmentée de ce gène a également été observée chez les fumeurs [278]. Dans cette étude, l'induction d'ENTPD8 était irréversible, et aussi retrouvée chez les individus ayant arrêté de fumer. ENTPD8 étant une enzyme impliquée dans le métabolisme des purines et des pyrimidines, les auteurs ont suggéré que cette protéine pouvait être impliquée dans la création d'adduits à l'ADN. D'autres GED avec une expression augmentée observée dans les 3 groupes, EPGN et EREG, sont des ligands activateurs de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ayant un rôle bien caractérisé dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire [41]. EREG, codant pour l'épiréguline est notamment impliqué dans des mécanismes inflammatoires comprenant la prolifération cellulaire, et également dans la réparation et régénération tissulaire. Son potentiel prolifératif a également été associé avec le développement de tumeurs pulmonaires à des stades précoces [279–281]. EPGN, codant pour l'épigène est le ligand d'EGFR le plus récent découvert à ce jour. EPGN est notamment activé par nrf2, et pourrait également contribuer à la progression précoce de tumeurs via son rôle pro-prolifératif médié par EGFR [279].

Outre les GED observés dans les 3 groupes, la dérégulation de certains gènes ayant un rôle démontré dans l'inflammation pulmonaire (i.e. FOSL1↑, FGF1↓, CITED2↓) était spécifique aux groupes des DHBE (communes aux DHBE-asthme et DHBE-BPCO) et particulièrement accentuée dans le groupe des DHBE-BPCO. La protéine FOS-related antigen-1 (FRA-1) encodée par le gène FOSL1 est une sous unité du complexe AP-1. Elle est impliquée notamment dans la réponse inflammatoire macrophagique dans des souris exposées à la fumée de cigarette [282], et son activation par les PM issues de la combustion induit l'expression de gènes impliqués dans la réparation tissulaire dans les poumons [283]. FGF-1 codant pour le Fibroblast Growth Factor-1 aurait un rôle anti-fibrotique démontré dans les poumons [284,285] et dans les reins [286]. Toutefois, des études ont observé une expression constitutive augmentée de FGF-1 dans les tissus pulmonaires de patients atteints de BPCO [287] et de fibrose pulmonaire idiopathique [288]. Le gène CITED2 codant pour la protéine Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) régule l'expression des MMP-1 et MMP-13 et leurs effets protéolytiques, ainsi que NF-κB et la transcription des gènes associés [289]. En outre, il a aussi été montré que CITED 2 atténue la réponse pro-inflammatoire et l'activation des macrophages [290]. Par conséquent, l'expression augmentée de FOSL1 couplée à la régulation négative de FGF-1 et CITED2 entraînée par une exposition aux PUF pourrait contribuer à accentuer le remodelage des tissus pulmonaires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires observée dans les bronchopneumopathies chroniques.

Observée dans le groupe des DHBE-BPCO spécifiquement, la dérégulation de certaines gènes (i.e. FGR↑, WNT7B↑, VIPR1↑, PPARGC1A↓) entraînée par une exposition aux PUF pourrait également avoir un rôle majeur dans la pathogenèse de de la BPCO. Il a été montré grâce à des modèles de souris FGR^{-/-} que l'expression de cette protéine contribue de manière importante à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, et possiblement au recrutement de neutrophiles et de macrophages dans les poumons [291,292]. Le gène WNT7B a un rôle critique dans le développement pulmonaire normal en promouvant la prolifération des cellules épithéliales et mésenchymateuses [293,294]. Par ailleurs, la voie wnt est impliquée dans la réparation tissulaire et stimule l'accumulation de matrice extracellulaire médiée par les fibroblastes dans la fibrose pulmonaire [295–298]. VIPR1, code pour le

Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1, un récepteur du neurotransmetteur VIP, localisé majoritairement dans les glandes sous muqueuses. L'interaction de VIP avec son récepteur stimule la sécrétion de mucus [299], ainsi que la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 [300]. Une étude a montré que les patients atteints de BPCO présentaient une sensibilité réduite à l'induction de VIP par rapport à des sujets sains [301]. Par ailleurs, les récepteurs VIPR1 sont en nombre plus important dans la muqueuse respiratoire des patients atteints de BPCO [302]. Enfin, le gène PPARGC1A code pour le Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α). PGC-1 α est connu pour être un régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif [110–112]. En coopération avec nrf2, son activité cotranscriptionnelle induit également, l'expression de gènes antioxydants (e.g. GCL, HO-1) [303,304]. Son expression augmentée observée à des stades précoces de BPCO a été proposé comme un mécanisme de compensation. A l'inverse, l'expression réduite de PGC1- α dans les poumons de patients atteints de BPCO à des stades modérés à sévères, pourrait favoriser l'aggravation de la pathologie [117], [114]. Plus largement, la dysfonction mitochondriale et la dérégulation du cycle dynamique des mitochondries au niveau pulmonaire contribueraient de manière importante dans la pathogénèse des bronchopneumopathies chroniques [97,106,120]. En somme, malgré une variabilité intragroupe relativement importante, l'analyse du profil transcriptomique des cellules nous a permis d'identifier certains gènes associés à la réponse biologique aux PM à faible dose. Néanmoins, pour tenir compte des modifications post-traductionnelles, il serait nécessaire dans un prochain travail de valider l'expression des gènes d'intérêts au niveau protéique afin de confirmer leur réelle implication dans l'initiation ou l'exacerbation des symptômes respiratoires induits par l'exposition aux PM.

Cette étude est la première à notre connaissance à utiliser des modèles différenciés d'épithélia sains ou pathologiques pour étudier leur sensibilité respective à des PF ou à des PUF, et la toxicité respective des PF ou des PUF collectées sur un même site. Une sensibilité accrue des modèles d'épithélia issus de donneurs pathologique, particulièrement dans les cellules issues de donneurs atteints de BPCO, et une toxicité plus importante des PUF à masse égale ont été observés sur la base de la sécrétion de cytokines proinflammatoires, et des profils transcriptomiques. Néanmoins, la BPCO et l'asthme sont des pathologies qui comportent différents

stades ainsi qu'une grande diversité dans leurs caractéristiques et leurs manifestations au sein de la population. Le manque d'informations relatives à la provenance des sujets, à leurs antécédents et au stade de la maladie ne permet pas dans notre étude de distinguer clairement les phénomènes liés à la sévérité de la pathologie, aux potentiels traitements, ou autres phénomènes liés à des facteurs individuels. Ainsi, d'autres études seront nécessaires pour limiter la variabilité interindividuelle et caractériser de manière plus spécifique les modèles d'épithélia bronchiques différenciés. La quasi similarité de composition chimique observée entre les particules fines et ultrafines suggère que la plus forte réactivité observée avec les PUF proviendrait principalement de leur plus grande surface spécifique et de leur nombre plus important par unité de masse [9]. Outre leur réactivité biologique importante, les PUF peuvent migrer plus efficacement dans les régions profondes de l'appareil respiratoire et y persister durablement [171,173,174]. Compte tenu des résultats de cette étude et de ceux décrits dans la littérature, l'intégration des PUF dans les mesures de la qualité de l'air et la mise en place d'une réglementation plus adaptée à leur prise en compte pourraient diminuer l'impact sanitaire démontré de la pollution atmosphérique.

2. Caractérisation de la fonction et de la dynamique mitochondriale

De récentes publications de même que certains de nos travaux suggèrent d'une part que la mitochondrie est une cible critique des PM_{2.5}, et d'autre part, que les dysfonctions mitochondriales pourraient être impliquées dans la pathogenèse des BPC. Dans ce contexte, dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement à l'étude de la dynamique et de la fonction mitochondriales en réponse à l'exposition à de faibles doses de PF ou de PUF, sur la lignée épithéliale bronchique humaine BEAS-2B.

2.1. Cytotoxicité et apoptose

La première étape de ce travail consistait à confirmer l'absence d'une cytotoxicité significative, et notamment l'absence d'apoptose avec le protocole d'exposition utilisé. L'objectif de ce travail étant axé sur l'étude des processus adaptatifs survenant au niveau mitochondrial en réponse à de faibles doses de particules. La cytotoxicité a été évaluée après une exposition aiguë (1 dose) ou répétée (3 doses), à 5 µg/cm² de PF ou de PUF. Le test du Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) a été utilisé, après perméabilisation des cellules, pour marquer l'ADN fragmenté (Figure 56). La fragmentation de l'ADN survenant au cours de la dernière étape du processus d'apoptose. La sonde SYTOX® a été utilisée pour évaluer la perméabilisation des membranes cellulaires en marquant l'ADN des cellules en apoptose ou en nécrose (Figure 56).

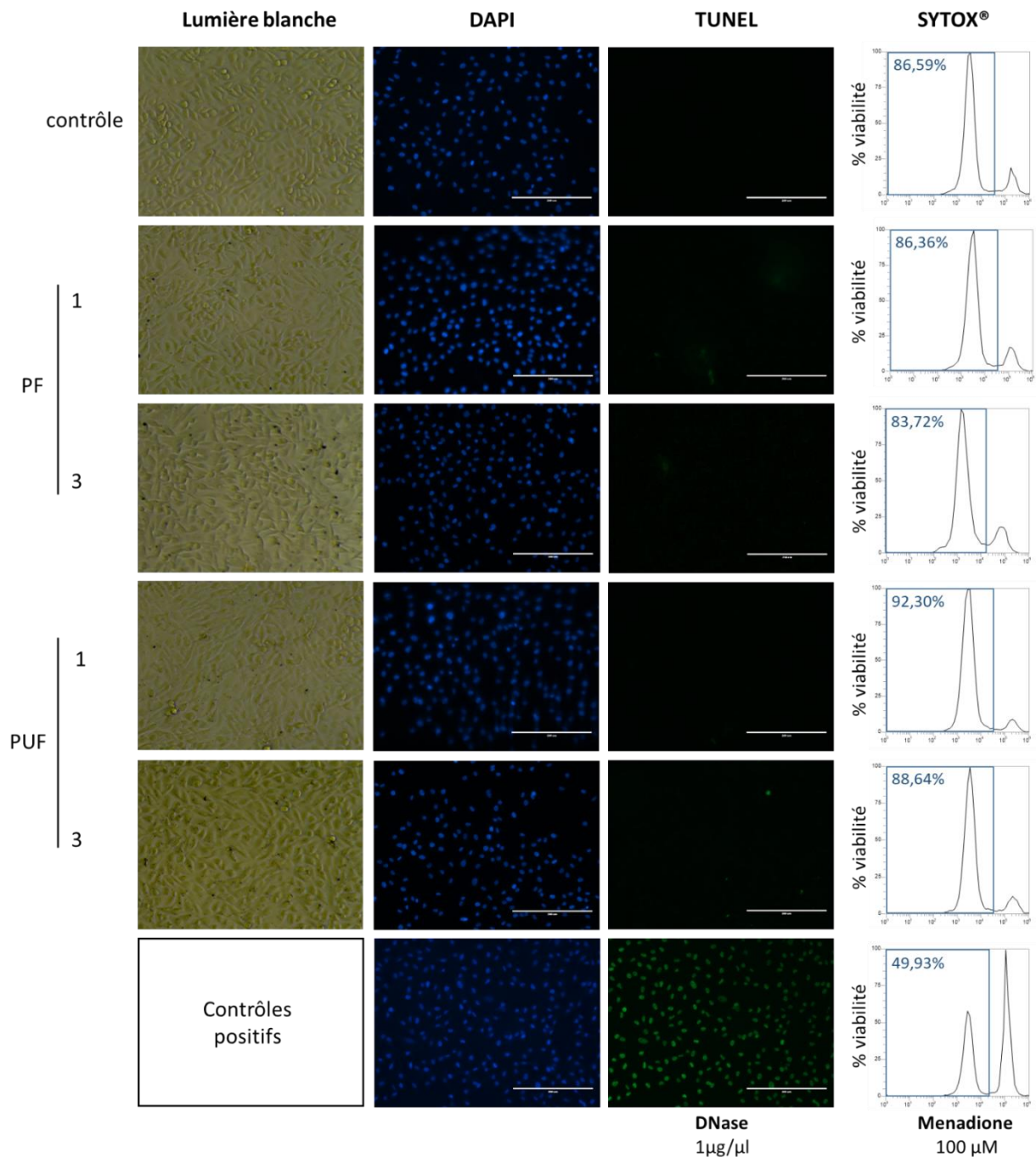


Figure 56 : Fragmentation de l'ADN et perméabilisation membranaire analysés respectivement par Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) et marquage au SYTOX®

Les expositions aiguë et répétée aux PF et aux PUF à faible dose (5 µg/cm²) n'ont pas induit de fragmentation de l'ADN, ni de perméabilisation membranaire, contrairement aux contrôles positifs utilisés. Comme le montrent les images en lumière blanche, aucune altération morphologique (e.g. arrondissement, perte de confluence) n'a été observée. Les points noirs observés sur les tapis cellulaires exposés sont des agrégats de particules. Afin de confirmer l'utilisation d'une dose subapoptotique pour

la caractérisation de la fonction mitochondriale, l'activité des caspases a été mesurée (Figure 57). L'activation des caspases est un marqueur précoce de l'induction de l'apoptose. La caspase 9 est initiatrice de la voie apoptotique intracellulaire (d'origine mitochondriale), elle est induite par la libération mitochondriale du cytochrome c. La caspase 8 est initiatrice de la voie apoptotique extracellulaire, elle est induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire par des ligands spécifiques. Les caspases 3 et 7 sont appelées les caspases effectrices. Elles sont induites par les caspases initiatrices (e.g. CAS 8 et 9) et sont des médiateurs clés dans l'initiation du processus apoptotique.

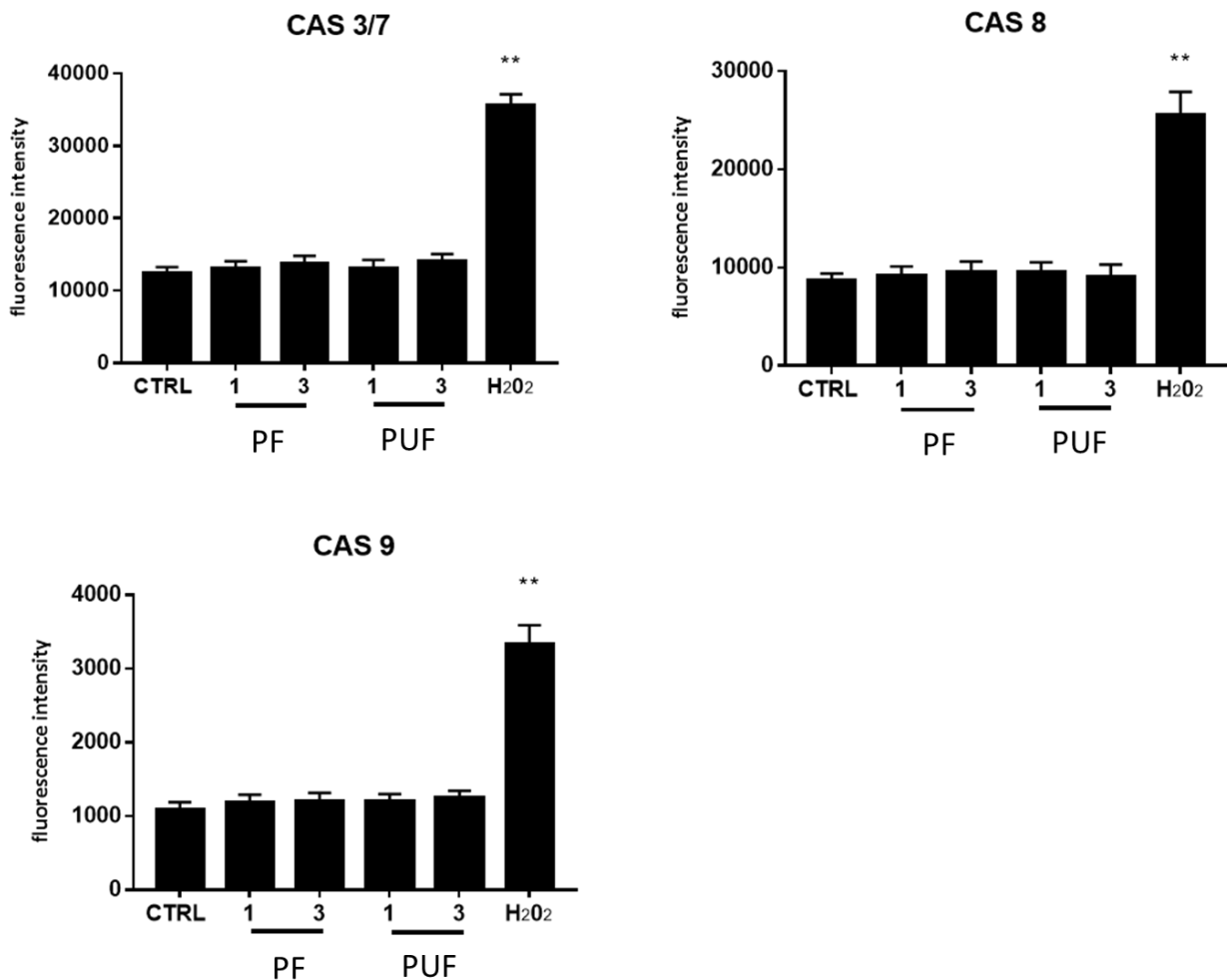


Figure 57 : Activité des caspases 3,7,8 et 9 après exposition aiguë (1) ou répétée (3), t test, moyennes +/- écarts types (n=8), **p < 0,01 : seuil de significativité par rapport aux contrôle

L'exposition aux PF ou aux PUF n'a pas induit d'augmentation significative d'activité des caspases, contrairement au contrôle positif (H₂O₂). L'ensemble de ces

résultats confirme l'utilisation d'une dose subapoptotique en condition aiguë et répétée pour la caractérisation de la fonction et de la dynamique mitochondriale.

2.2. Potentiel de membrane mitochondrial

La différence de potentiel ($\Delta\psi_m$) entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire est utilisé pour la production d'ATP. Le $\Delta\psi_m$ a été mesuré par marquage des cellules avec la sonde Tétraméthylrhodamine, Méthyl Ester, Perchlorate (TMRM, ThermoFisher Scientific) (Figure 58). Le SYTOX® a été utilisé pour isoler les cellules vivantes lors de l'analyse.

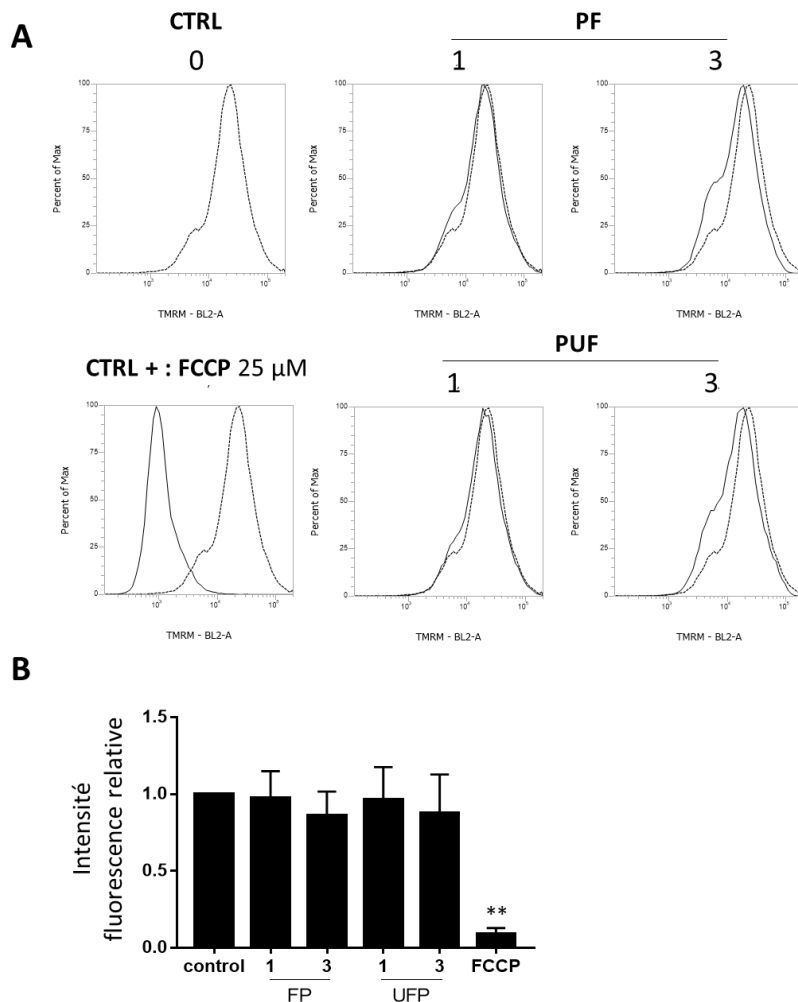


Figure 58 : Potentiel de membrane mitochondrial. (A) : Histogrammes issus d'une expérimentation de cytométrie en flux (B) : moyennes +/- écarts types (n=3), t test, **p < 0,01 : seuil de significativité par rapport aux contrôles

Comme le montre la Figure 58, aucune modification significative du $\Delta\psi_m$ n'a été observée après exposition aux PF et aux PUF. Une légère tendance à la diminution a été observée avec une exposition répétée aux deux types de particules. L'utilisation de la Carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazo (FCCP) a permis d'obtenir une dépolarisation complète, le signal après administration de FCCP étant quasi similaire au signal du contrôle non marqué (non montré).

2.3. Production d'ATP

La production d'ATP témoigne du fonctionnement du métabolisme mitochondrial. La concentration en ATP intracellulaire a été mesurée en réponse à des doses croissantes de PF ou de PUF, en condition aiguë (1 exposition) ou répétée (3 expositions) (Figure 59A).

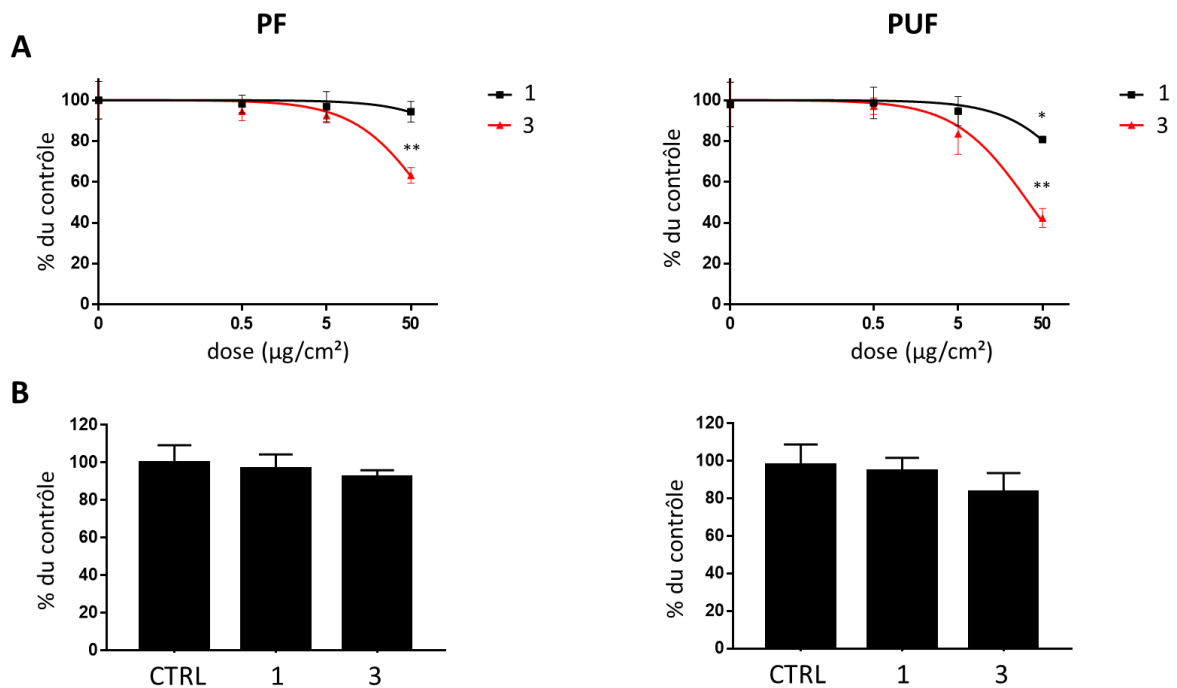


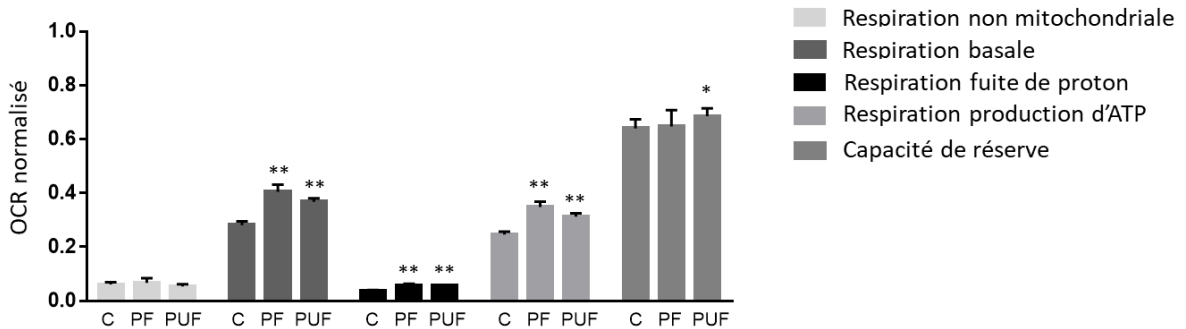
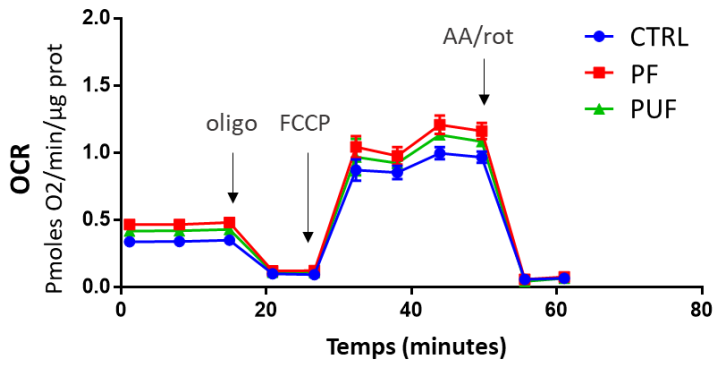
Figure 59 : Concentration d'ATP intracellulaire. (A) courbe dose-réponse, (B) concentration d'ATP à 5 µg/cm². Moyennes +/- écarts types (n=3), t test, *p < 0,05, **p < 0,01 : seuil de significativité par rapport aux contrôle

L'exposition des cellules à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ n'a pas entraîné de modification significative de la production d'ATP. Une légère tendance à la diminution a été observée suite à l'exposition répétée, particulièrement avec les PUF (Figure 59B).

2.4. Respiration mitochondriale

Le taux de consommation d'oxygène ou Oxygen Consumption Rate (OCR) a été mesuré après exposition aiguë ou répétée des cellules aux PF ou aux PUF. L'analyseur de flux extracellulaire (XF) permet de mesurer la quantité d' O_2 consommée en temps réel, en réponse à l'ajout séquentiel de différents inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Cette technologie permet d'isoler la respiration d'origine mitochondriale et en déduire la capacité de réserve, la consommation d' O_2 utilisée pour la production d'ATP et celle utilisée pour la fuite de proton (cf. matériel et méthode 0). Comme le montre la Figure 60, les expositions aiguë et répétée, aux PF et aux PUF ont entraîné une augmentation de la respiration d'origine mitochondriale (respiration basale). Cette augmentation de la respiration basale résulte à la fois d'une augmentation de l' O_2 consommé par la production d'ATP, et d'une augmentation de l' O_2 consommé par la fuite de proton. De manière intéressante, une augmentation de la respiration maximale et une tendance à l'augmentation de la capacité de réserve globale ont été observées, suggérant une augmentation de la masse mitochondriale. La respiration non mitochondriale n'a pas été modifiée par le traitement.

Exposition aiguë



Exposition répétée

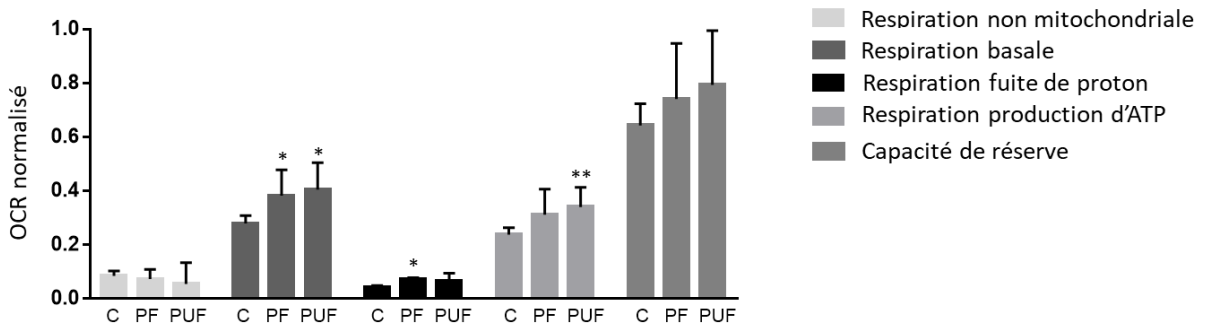
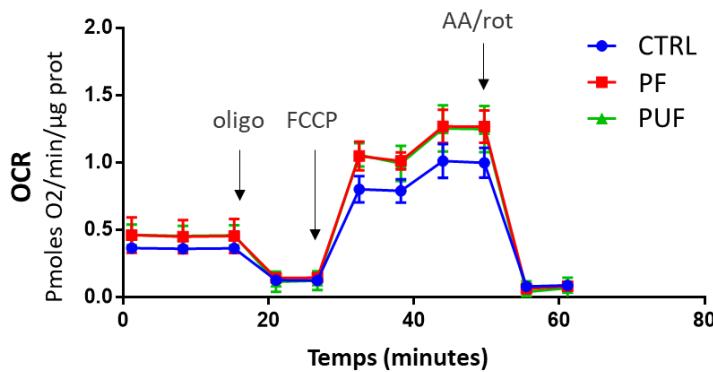
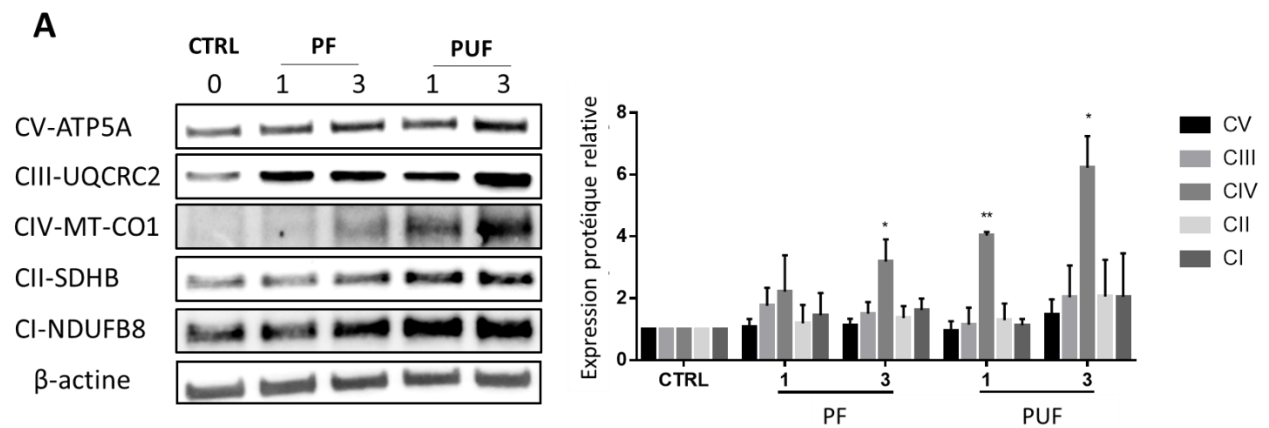


Figure 60 : Consommation d'oxygène (OCR). Moyenne +/- écarts types (n=7) représentatif de 3 expérimentations indépendantes, t test, *p < 0,05, **p < 0,01 : seuils de significativité par rapport aux contrôle

2.5. Masse mitochondriale

La masse mitochondriale a été évaluée en mesurant l'expression de sous unités des complexes de la CRM (i.e. CI (NADH-coenzyme Q oxydoréductase), CII (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), CIV (cytochrome c oxydase), CV (ATP synthase)) (Figure 61A) et des porines transmembranaires Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20 (TOMM20) et Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) par western blot (Figure 61B). L'exposition aux particules a induit une tendance à l'augmentation de tous les complexes de la CRM avec une augmentation significative de l'expression complexe IV (CIV) (Figure 61A). L'expression de VDAC et TOMM20, a aussi été augmentée (Figure 61B). L'expression des complexes de la CRM (et notamment du CIV) et des porines transmembranaires était plus importante avec une exposition aux PUF, et semblait être accentuée avec une exposition répétée. Ces observations témoignent d'une augmentation de la masse mitochondriale et concordent avec l'augmentation de la respiration mitochondriale.



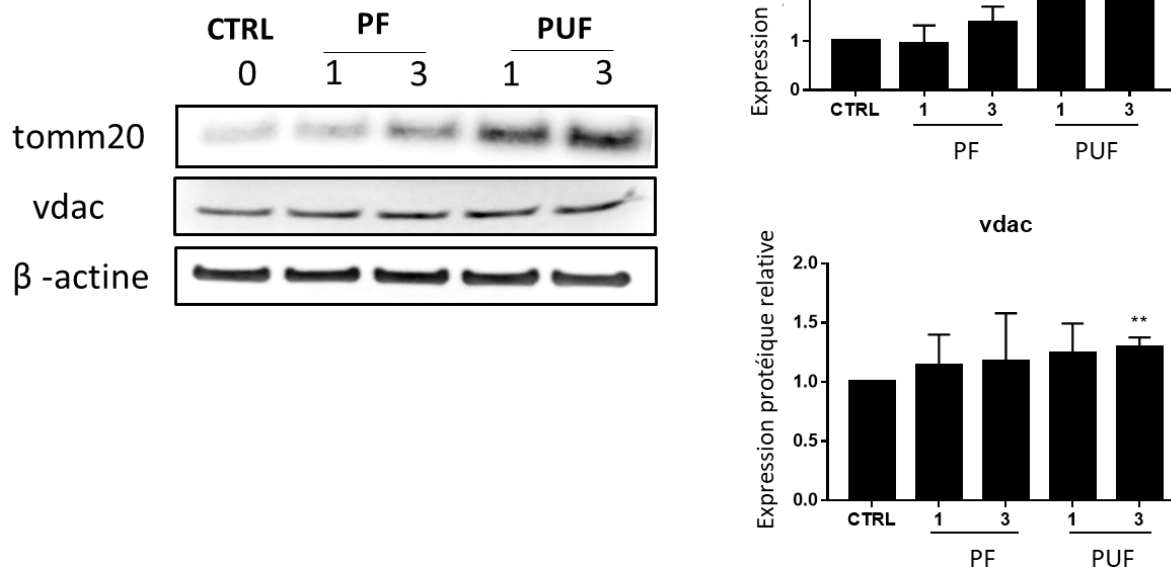
B

Figure 61 : Expression des marqueurs de masse mitochondriale. (A) : sous unités des complexes de la CRM (B) : Porines transmembranaires ubiquitaires. Moyennes +/- écart type (n=3), t test, *p < 0,05, **p < 0,01 : seuils de significativité par rapport aux contrôle

2.6. Production d'anion superoxyde

La production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), une EROm, a été mesurée avec la sonde MitoSOX™ par cytométrie en flux. La ménadione a été utilisée comme contrôle positif pour générer la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans les cellules. L'exposition aiguë, et particulièrement répétée aux PUF augmente significativement la production d' $O_2^{\cdot-}$. Une tendance à l'augmentation a aussi été observée avec une exposition aux PF, uniquement en condition répétée (Figure 62).

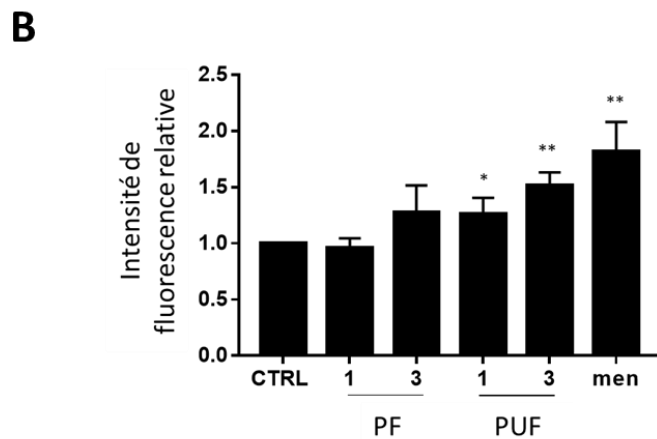
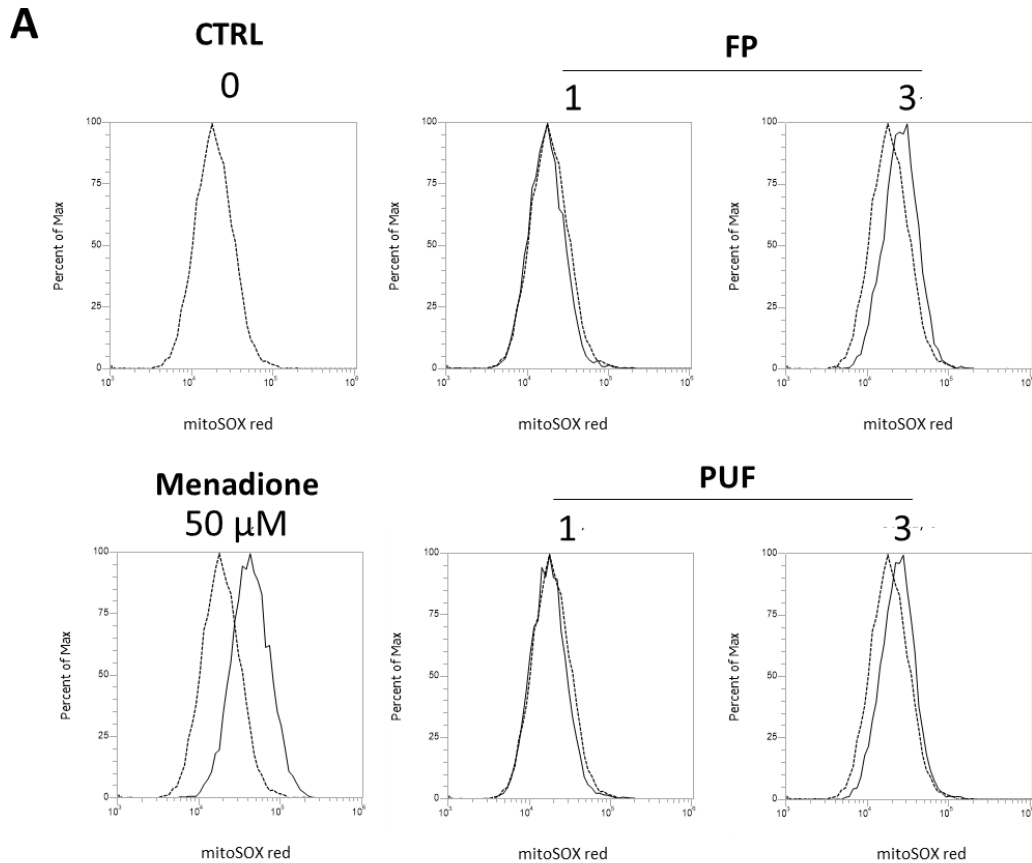


Figure 62 : Production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (A) : Histogrammes issus d'une expérimentation de cytométrie en flux (B) : moyennes +/- écarts types ($n=3$), t test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$: seuils de significativité par rapport aux contrôle

La production accentuée d' $O_2^{\cdot -}$ et sa localisation mitochondriale ont été confirmés par une observation microscopique des cellules comarquées avec MitoTracker® et MitoSOX™ (Figure 63). L'augmentation d' $O_2^{\cdot -}$ dans la cellule peut témoigner d'un stress mitochondrial et/ou peut être liée à l'augmentation de la masse mitochondriale.

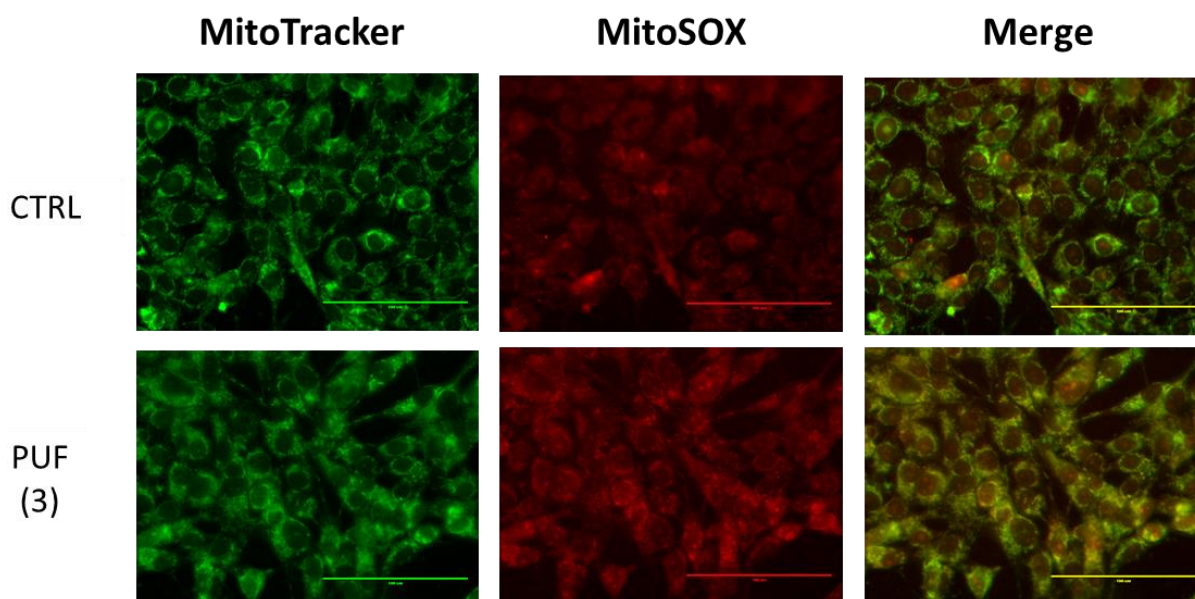


Figure 63 : Comarquage MitoTracker/MitoSOX après exposition répétée aux PUF (PUF (3))

2.7. Réponse antioxydante

L'expression des enzymes antioxydantes induites par la voie nrf2-ARE (Hème Oxygénase-1 (HO-1), NADPH Quinone Oxydoréductase 1 (NQO-1) Glutamate Cysteine Ligase Modifier subunit (GCLM)) a été analysée par western blot. Comme le montre la Figure 64, l'exposition des cellules aux PF, et particulièrement aux PUF a induit l'activation de la voie nrf2. L'expression des protéines analysée était généralement plus importante avec une exposition aux PUF qu'avec une exposition aux PF.

L'activité de liaison de nrf2 a la séquence ARE a été mesurée pour évaluer son activité transcriptionnelle. Etonnamment, les résultats de ce test montrent une activation significative de nrf2 avec une exposition aiguë mais pas avec une exposition répétée (Figure 65).

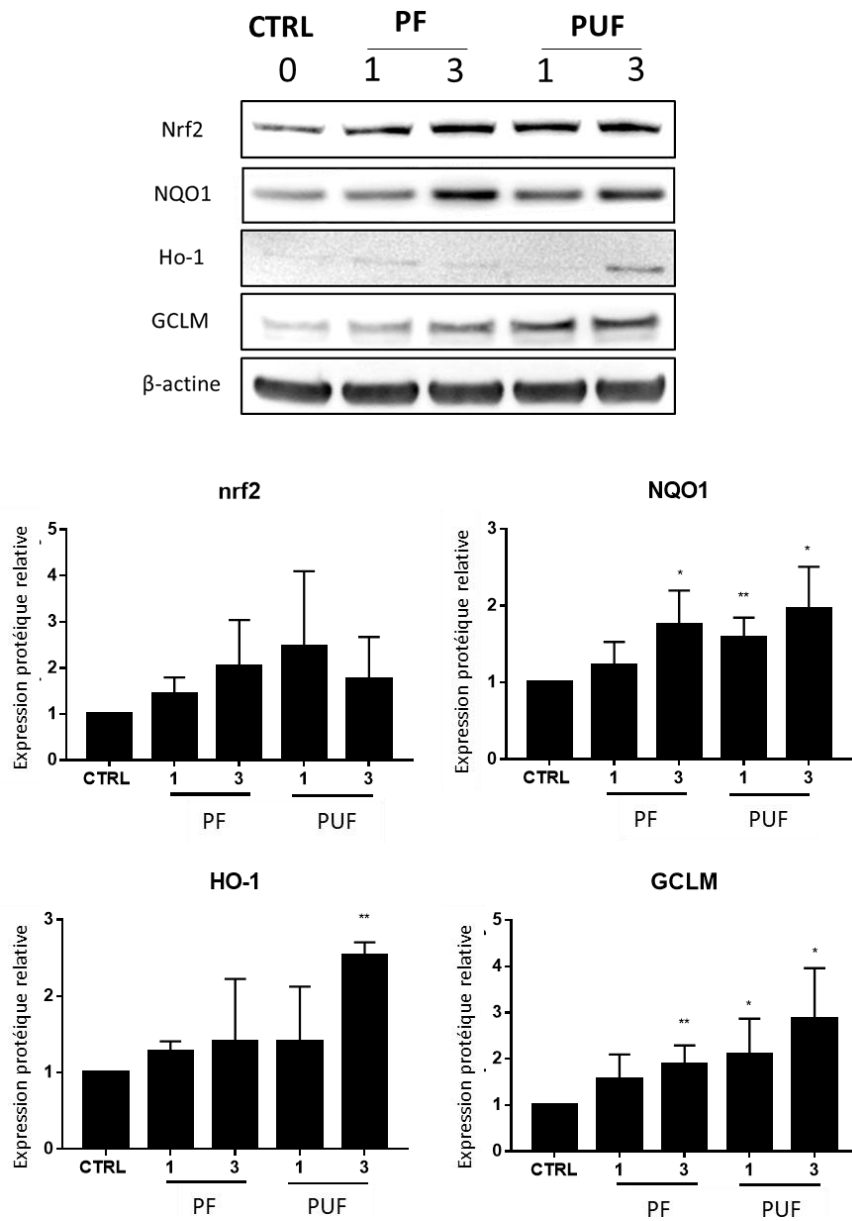


Figure 64 : Expression des protéines de la voie nrf2-ARE. Moyennes \pm écart type (n=3), t test, *p < 0,05, **p < 0,01 : seuils de significativité par rapport aux contrôle

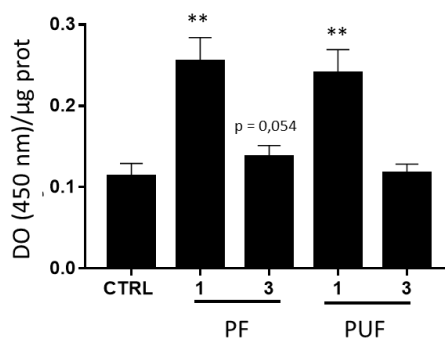


Figure 65 : Activité de liaison de nrf2 à la séquence promotrice. Moyennes \pm écart type (n=4), t test, *p < 0,05, **p < 0,01 : seuils de significativité par rapport aux contrôle

2.8. Dynamique mitochondriale

Le cycle dynamique permet de pérenniser le réseau des mitochondries. Il maintient un équilibre entre la fusion, qui optimise l'efficacité métabolique et les échanges de composants, et la fission qui permet notamment d'éliminer les zones défectueuses par mitophagie. Le protocole d'exposition aiguë (1) ou répété (3) décrit précédemment a été utilisé pour étudier l'expression des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale par western blot.

2.8.1. Expression des protéines de fusion

L'Optic Atrophy-1 (OPA-1, aussi appelée mitochondrial dynamin like GTPase), et les mitofusines (mfn-1 et 2) sont les protéines effectrices de la fusion mitochondriale. Elles interviennent respectivement dans la fusion des membranes internes et externes. L'exposition aux PF et aux PUF induit une légère tendance à l'augmentation de l'expression des mfn. Toutefois l'effet est faible ($FC < 1,5$) et non significatif. Une augmentation significative de l'expression de OPA-1 a été observée après exposition répétée aux PUF, toutefois là encore, l'augmentation est légère ($FC < 1,5$) (Figure 66).

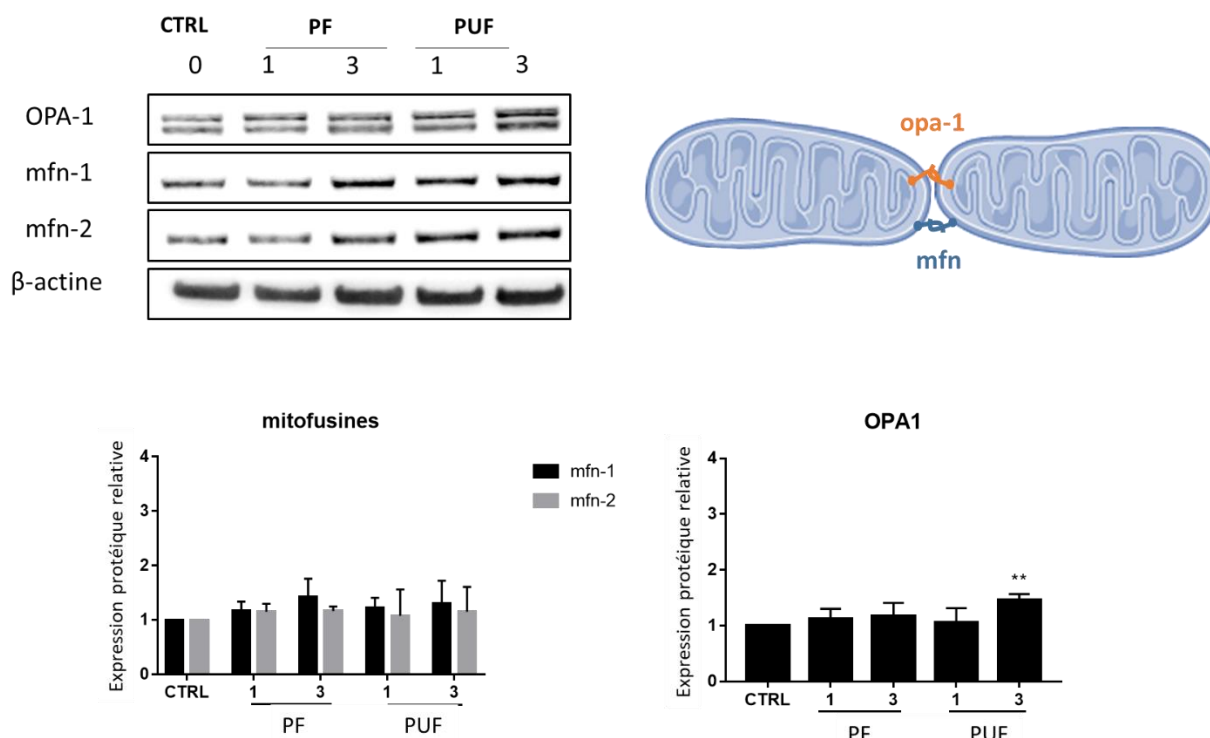


Figure 66 : Expression des protéines de fusion par western blot. Moyennes +/- écart type (n=3), t test, **p < 0,01 : seuil de significativité par rapport aux contrôle

2.8.2. Expression des protéines de fission

Les protéines mitochondrial fission 1 protein (fis-1) et dynamin-related protein 1 (drp1) interviennent dans le processus de fission mitochondriale. L'expression de fis-1 sur la membrane externe des mitochondries permet le recrutement de la protéine cytoplasmique drp1 sur la membrane pour assurer la fission mitochondriale. La phosphorylation de drp1 en sérine 616 (s616) active la fission tandis que sa phosphorylation en sérine 637 (s637) inhibe son activité (Figure 67). L'exposition aux PF et particulièrement aux PUF induit une augmentation significative de l'expression de drp1 et/ou de sa forme phosphorylée activatrice (P-drp1 (s616)), sans modification de l'expression de sa forme inhibitrice (P-drp1 (s637)). Une tendance à l'augmentation de l'expression de fis-1 est aussi observée malgré une variabilité plus importante dans les résultats, l'augmentation est significative avec une exposition répétée aux PUF.

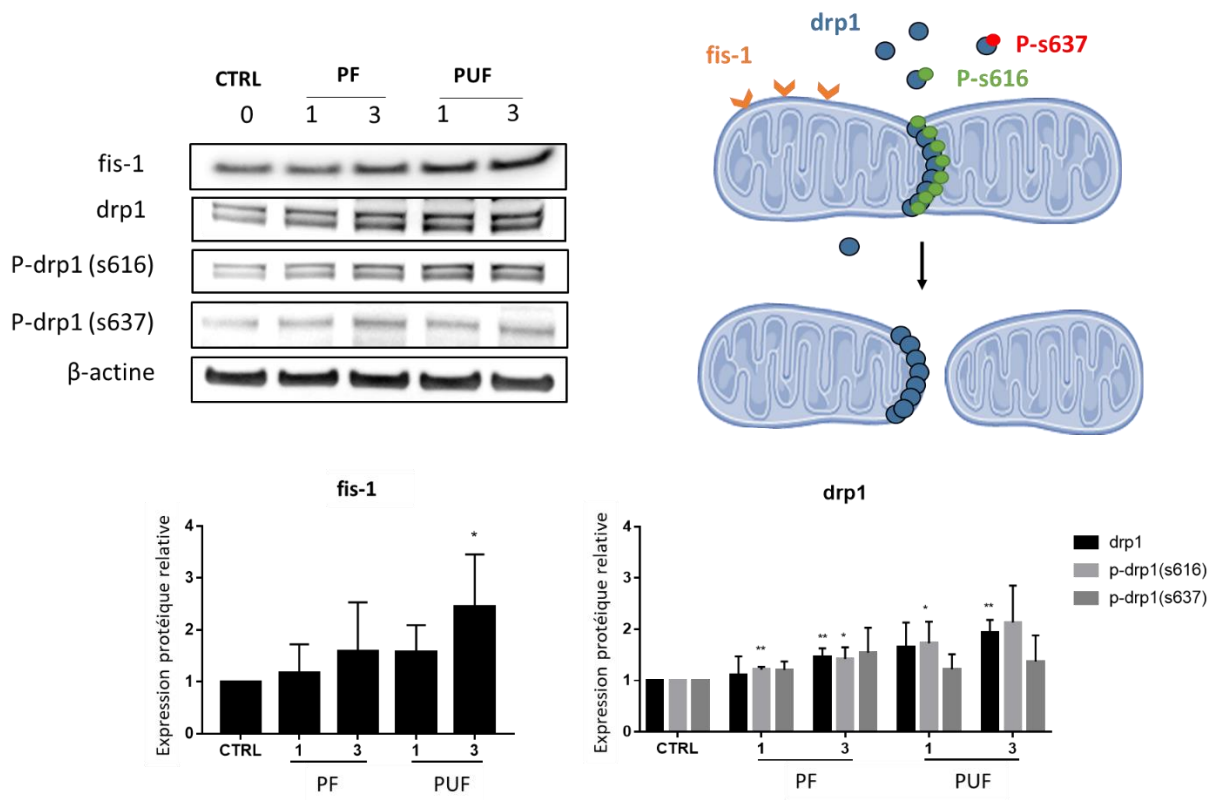


Figure 67 : Expression des protéines de fission par western blot. Moyennes +/- écart type (n=3), t test, **p < 0,01 : seuil de significativité par rapport aux contrôle

2.9. Discussion

Outre leur rôle primordial de centrale énergétique, les mitochondries sont des senseurs de l'homéostasie calcique et du statut redox de la cellule. Elles interviennent dans la signalisation cellulaire en régulant les défenses antioxydantes, la réaction inflammatoire et le déclenchement de l'apoptose. Un nombre croissant d'études montre que les mitochondries peuvent jouer un rôle clef, dans le développement de l'asthme [101,102,106,121], de la BPCO [97,118,120], et par extension, dans le syndrome de chevauchement récemment décrit : Asthma COPD Overlap Syndrome (ACOS) [305]. Les dysfonctions mitochondriales induites par le stress oxydant et l'inflammation chronique dans ces pathologies sont aujourd'hui décrites comme faisant partie intégrante des BPC. En outre leur ciblage thérapeutique préclinique permettrait de diminuer les symptômes inflammatoires associés [97,106,119–121]. A ce jour, peu de données ont été publiées sur les dysfonctions métaboliques mitochondriales induites par une exposition aux PM, la mitochondrie étant essentiellement étudiée dans le cadre de la toxicité des PM et de l'induction de l'apoptose consécutive. Des travaux réalisés récemment dans notre équipe [204] ont montré qu'une exposition répétée de cellules pulmonaires à des doses sub-toxiques de PM_{2.5} impacte significativement la respiration mitochondriale, diminue la production d'ATP associée et induit une réaction inflammatoire. De manière intéressante, nous avons observé qu'à une dose plus faible, les PM_{2.5} induisaient un stress mitochondrial caractérisé par une diminution du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) et la production de radicaux libres sans diminuer significativement la respiration et la concentration d'ATP intracellulaire. L'activation précoce de la voie nrf2-ARE observée dans cette étude a été proposé comme un mécanisme de régulation pour maintenir la fonction mitochondriale. Avec pour objectif d'approfondir ces résultats, la deuxième partie de ce travail était consacrée, de manière plus spécifique, à la caractérisation de la fonction et de la dynamique mitochondriale en réponse à de faibles doses (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de PF ou de PUF. Dans le cadre de ce travail, la lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine BEAS-2B a été utilisée comme modèle d'étude.

L'étude de différents marqueurs de mort cellulaire (i.e. SYTOX, [ATP], TUNEL, activité des caspases) après exposition aux PF et aux PUF a permis de confirmer l'absence de cytotoxicité, et notamment l'absence d'apoptose avec la dose utilisée, en condition aiguë, et répétée. En outre, malgré une tendance à la diminution suivant

l'exposition répétée aux deux fractions de PM, le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) de même que la concentration d'ATP intracellulaire n'ont pas été significativement modifiés. Au contraire, plusieurs études ont décrit une diminution plus ou moins importante du $\Delta\Psi_m$ suite à une exposition *in vitro* aux PM [204–208,306]. Néanmoins, l'objectif de notre protocole d'exposition était d'utiliser la plus faible dose possible pouvant déclencher des mécanismes d'adaptation et de survie cellulaire.

L'exposition aiguë aux PUF, ainsi que l'exposition répétée aux deux types de PM, et particulièrement aux PUF, a induit une augmentation de la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), témoignant d'un stress mitochondrial. Le stress oxydant induit a déclenché l'activation de la voie nrf2-ARE, et des enzymes antioxydantes reliées à l'activation de cette voie de signalisation (i.e. Ho-1, NQO1, GCLM). De manière surprenante, la liaison de nrf2 aux séquences ARE de l'ADN n'a été observée qu'avec une exposition aiguë, tandis que l'expression des protéines de la voie nrf2 était davantage observée en condition répétée. Ce phénomène pourrait potentiellement être expliqué par une cinétique d'oscillation récemment proposée dans l'activité de nrf2. En effet, l'activation transcriptionnelle de nrf2 survient davantage par une augmentation de la fréquence de sa translocation nucléaire, que par une augmentation de sa concentration totale dans la cellule. La protéine serait régulièrement expulsée du compartiment nucléaire pour éviter son accumulation et réévaluer l'environnement cellulaire, puis retransloquée dans le noyau [307,308]. Les auteurs d'une étude ont comparé ce mécanisme à un système de capteur sans fil [309]. Une deuxième hypothèse pourrait être l'adaptation au stress des cellules avec une exposition répétée, et un décalage cinétique entre l'activité transcriptionnelle de nrf2 et la dégradation des protéines en aval.

Le stress oxydant généré par les PM pouvant potentiellement impacter le métabolisme énergétique des mitochondries, leur consommation d'oxygène en temps réel a été analysée avec la technologie du Seahorse XF. Une augmentation de la consommation d'oxygène (O_2) cellulaire a été observée après exposition des cellules aux PF et aux PUF. Cette augmentation de la consommation d' O_2 n'était plus observée après l'administration d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), l'antimycine A et la roténone, ce qui indique que l'augmentation de la respiration était spécifiquement d'origine mitochondriale. Outre l'augmentation de la respiration basale, l'exposition aux particules a aussi entraîné une augmentation équivalente de la

respiration maximale, obtenue après traitement au FCCP. Une récente étude a également observé une augmentation de la consommation d'O₂ cellulaire en exposant des cellules BEAS-2B à une faible dose de 1,2-naphthoquinone, un HAP systématiquement retrouvé dans les PM. Toutefois, cette augmentation n'était pas retrouvée quand l'expérimentation était faite sur des mitochondries isolées et que les résultats étaient rapportés à la quantité de mitochondries [310]. Ces éléments suggéraient que l'augmentation de la consommation d'O₂ mitochondriale observée dans notre étude pourrait potentiellement être liée à une augmentation de la masse mitochondriale dans les cellules plutôt que d'une augmentation de l'activité métabolique des mitochondries. Pour tester cette hypothèse, l'expression de marqueurs de la masse mitochondriale (complexes de la CRM, porines transmembranaires ubiquitaires) a été analysée par western blot.

En effet, l'augmentation de la consommation d'O₂ mitochondriale était associée à l'augmentation de l'expression du cytochrome c oxydase (complexe IV de la CRM), où l'oxygène est consommé pour être réduit en eau, et une tendance à l'augmentation des autres complexes de la CRM. L'expression des porines transmembranaires VDAC et notamment de TOMM20 était aussi augmentée, particulièrement avec l'exposition aux PUF. De manière similaire, les résultats d'une étude s'intéressant aux effets à long terme de la fumée de cigarette sur des cellules BEAS-2B ont décrit une augmentation de l'expression des complexes de la CRM après 6 mois d'exposition [108]. Dans cette même étude, une expression accentuée des complexes de la CRM a aussi été décrite sur des cellules épithéliales bronchiques issues de donneurs atteints de BPCO, par rapport à des cellules de phénotype normal. Une autre étude a observé une augmentation du complexe IV dose dépendante en exposant des cellules aux PM_{2.5} [306]. Des études épidémiologiques ont montré des associations positives entre l'exposition aux PM₁₀ et PM_{2.5} et l'induction de voies de signalisations liées au métabolisme mitochondrial dans le sang, avec notamment avec une expression augmentée des gènes codants pour les complexes de de la CRM [210], et un nombre de mitochondrie plus important dans le sang [311]. D'après les auteurs, ces phénomènes peuvent indiquer un accroissement de la demande en énergie, pour éliminer les dommages aux composants cellulaires [210]. Ce mécanisme a aussi été proposé comme étant une réponse adaptative pour faire diminuer l'hypertension [311]. En effet, dans cette étude épidémiologique, l'exposition au carbone suie était associée

à une pression systolique et diastolique plus importante et une abondance mitochondriale dans le sang plus importante malgré une variabilité interindividuelle marquée. Dans la cohorte étudiée, les individus présentant un haut ratio d'ADN mitochondrial/ADN nucléaire dans le sang avaient une hypertension atténuée. A des doses plus importantes, toutefois non cytotoxiques, les PM peuvent entraîner une diminution de la consommation d'O₂ mitochondriale, généralement associée à une diminution du $\Delta\Psi_m$ [204,312,313].

L'accroissement de la masse mitochondriale décrite dans notre étude semble cohérente avec l'activation de nrf2. En effet, le principal régulateur de la biogénèse mitochondriale est le peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator (PGC1- α). Cette protéine est un cofacteur transcriptionnel, connu pour induire l'expression de nrf2 [115,303]. En coopération avec nrf2, PGC1- α stimule également l'expression du Nuclear Respiratory Factor-1 (nrf1), un autre facteur de transcription conduisant à l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse et la réparation mitochondriale (e.g. Mitochondrial transcription factor A (TFAM), Mitochondrial transcription factor B (TFBM)) [113,114]. En outre, le promoteur de nrf1 comporte des séquences ARE. L'activation de nrf2 peut donc induire la biogénèse mitochondriale via l'activation transcriptionnelle du Nuclear Respiratory Factor 1 (nrf1) [314]. Une augmentation de la masse mitochondriale, pourrait aussi résulter d'une anomalie du flux mitophagique, ne permettant plus d'éliminer correctement les mitochondries dysfonctionnantes. Ahmad et al. [119], s'intéressant aux effets de la fumée de cigarette sur des fibroblastes, ont observé une altération de la mitophagie, marquée par une diminution de la translocation de la protéine parkin sur les mitochondries endommagées. En conséquence, les auteurs ont observé une accumulation de masse mitochondriale. Ainsi, il serait intéressant dans la suite de ces travaux d'analyser l'équilibre entre la biogénèse et la mitophagie en conservant le protocole d'exposition à faible dose.

Le cycle dynamique des mitochondries est essentiel pour nombre de processus physiologiques de la cellule tels que la mitose, l'immunité cellulaire ou le contrôle qualité des mitochondries. La fission induit une fragmentation du réseau, permettant notamment d'éliminer les mitochondries défectueuses par mitophagie, ou de générer de nouveaux organites nécessaires à la biogénèse. La fusion induit au contraire une élongation du réseau, et est associée avec une augmentation de l'activité OXPHOS.

Elle peut être stimulée par une demande énergétique et est abolie par une dissipation du $\Delta\Psi_m$ [110,112]. L'expression des protéines impliquée dans la fusion/fission a été analysée afin d'évaluer l'effet des PM à faible dose sur cet équilibre. L'exposition répétée aux PF et aux PUF a entraîné une légère tendance à l'augmentation des protéines de fusion (i.e. mfn 1, mfn 2, OPA-1), avec une augmentation significative de l'expression d'OPA-1 induite par l'exposition aux PUF. Toutefois, l'augmentation de l'expression de ces protéines pourrait être due à l'augmentation de la masse mitochondriale observée, compte tenu de leur localisation mitochondriale. En revanche, l'exposition aux PF, et particulièrement aux PUF a induit une augmentation significative de l'expression des protéines de fission (fis1, drp1), avec un effet accentué observé en condition répétée. L'activation de drp1 a été montrée par sa phosphorylation en sérine 616. Une augmentation simultanée de l'expression des marqueurs de fusion et de fission (i.e. fis1, mfn1/2, drp1 et OPA1) a également été décrite sur des cellules BEAS-2B exposées à la fumée de cigarette [108], sur des SH-SY5Y (lignée dérivée d'un neuroblastome) exposées aux PM_{2.5} [306] ainsi que sur des rats exposés aux PM_{2.5} [315]. Ces changements sont parfois associés à des modifications morphologiques des mitochondries, à des doses plus ou moins élevées de PM. Ces changements ultrastructuraux peuvent comprendre un gonflement des mitochondries, une altération de l'organisation des crêtes mitochondriales [204,209,315] et une perte de densité des organites observés en microscopie [205,316]. Les PUF, par leur taille, sont plus enclines à être internalisées dans les tissus, dans les cellules, et potentiellement interagir directement avec les mitochondries. Ce point pourrait expliquer en partie leur plus forte toxicité mitochondriale observée dans notre étude, notamment sur l'induction des marqueurs de fusion/fission et la génération d'O₂⁻. Li et al. [209] ont observé l'internalisation de PUF dans les mitochondries de macrophages sanguins (RAW 264.7) et de cellules BEAS-2B. Dans cette étude, des PM_{2.5} étaient également localisées dans les mitochondries en moins grande quantité, et les dommages ultrastructuraux associés étaient moins importants qu'avec les PUF. Les PM₁₀ étaient localisées dans de larges vacuoles cytoplasmiques et n'induisaient pas de modifications structurelles des mitochondries. En utilisant des nanoparticules fluorescentes (quantum dots), Nguyen et al. [317] ont démontré l'internalisation de ces nanoparticules dans les mitochondries de cellules hépatiques (HepG2) en observant une fluorescence plus importante dans les mitochondries de cellules exposées. Toutefois, certaines études n'ont pas observé

d'internalisation mitochondriale des PUF, suggérant que la dose, les modèles *in vitro* utilisés ou les caractéristiques physicochimiques des particules peuvent influencer sur leur capacité à migrer dans les mitochondries. Une dérégulation de l'équilibre entre la fission et la fusion mitochondriale pourrait expliquer en partie le stress mitochondrial induit. D'autre part, le stress mitochondrial pourrait être à l'origine de cette dérégulation.

En somme, l'exposition des cellules BEAS-2B à une dose subapoptotique de PM à induit un stress mitochondrial marqué par une production accentuée d'O₂⁻ mitochondrial et l'activation de la réponse antioxydante médiée par la voie nrf2-ARE. Des modifications de l'expression des protéines du cycle dynamique, notamment en faveur d'une fission mitochondriale plus importante ont aussi été observées. Ces modifications étaient d'autant plus accentuées avec une exposition aux PUF, et à la suite d'une exposition répétée. L'exposition aux deux types de particules a entraîné une augmentation de la consommation d'O₂ mitochondriale couplée à une augmentation de la masse mitochondriale. Le $\Delta\Psi_m$ global (non normalisé par rapport à la quantité de mitochondrie) et la concentration en ATP n'ayant pas été significativement altérés, l'augmentation de la masse mitochondriale pourrait constituer un mécanisme d'adaptation de la cellule, pour maintenir la production d'ATP. Ce phénomène pourrait aussi résulter d'une dysfonction de la mitophagie. Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'exposition aux PM à faible dose a entraîné une accumulation de mitochondries dysfonctionnantes dans les cellules pulmonaires, marquée par une augmentation de la masse mitochondriale, sans augmentation du $\Delta\Psi_m$. La dysfonction mitochondriale est une caractéristique décrite notamment dans la sénescence cellulaire, et dans les maladies liées à l'âge dont la BPCO fait partie [104,108,119]. La sénescence cellulaire a par ailleurs été associée à une augmentation de la masse mitochondriale dans des fibroblastes à un stade tardif de prolifération [318]. L'altération de la fonction mitochondriale et le déséquilibre du cycle dynamique induit pourrait donc constituer un mécanisme de toxicité respiratoire précoce des PM. En outre, ces dysfonctions mitochondriales pourraient contribuer de manière importante à l'initiation et/ou l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques par la pollution de l'air.

Conclusion et perspectives

Le premier objectif de ce travail était de prélever et de caractériser la fraction fine et la fraction ultrafine des PM du bassin dunkerquois. La caractérisation physicochimique des particules nous a permis de mettre en évidence la présence de divers composés oxydants, dont des HAP, ainsi qu'une concentration importante de certains métaux et métalloïdes (As, Pb, Zn, Ni, Pb, V) par rapport à ce qui est habituellement mesuré dans la région. Ces résultats soulignent le caractère urbano-industriel marqué de la zone de prélèvement. Malgré certaines différences de concentrations en éléments traces, une composition chimique plutôt similaire a été observée dans les PF et les PUF.

Des cellules épithéliales bronchiques humaines provenant de donneurs sains, asthmatiques et atteints de BPCO ont ensuite été utilisées pour évaluer l'effet d'une exposition à une faible dose de PF ou de PUF sur la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, les modulations épigénétiques et les profils d'expression géniques. La différenciation des cellules à l'interface air-liquide nous a permis d'obtenir des modèles *in vitro* d'épithélia bronchiques ciliés et sécrétoires, présentant de nombreuses similitudes avec l'épithélium *in vivo*. Les dosages de l'ATP intracellulaire et de la G6PD extracellulaire après exposition aiguë ou répétée aux PF ou aux PUF ont confirmé l'utilisation d'une dose sub-létale dans chaque cas. Alors qu'aucune modification n'a été observée sur la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires dans le groupe des donneurs sains, une sécrétion plus importante des cellules issues de donneurs asthmatiques, et particulièrement de donneurs atteints de BPCO a été observée après exposition aux deux fractions de particules. L'exposition aux PF et aux PUF a également induit une tendance à la diminution de l'activité HDAC dans les trois groupes étudiés, sans modification de l'activité HAT. L'augmentation de ratio HAT/HDAC était associée à une tendance à l'acétylation des H3K27, notamment dans le groupe des donneurs atteints de BPCO. L'acétylation plus importante des H3K27 induite par les PM, toutefois non significative, pourrait contribuer à maintenir les effets inflammatoires observés. L'analyse transcriptomique a identifié plusieurs gènes impliqués dans la réponse aux PF et aux PUF à faible dose dans chaque groupe. Alors que la voie de métabolisation de l'ahr semblait induite dans chaque groupe, la

dérégulation de certains gènes pouvant potentiellement contribuer à l'aggravation des phénomènes inflammatoires et au remodelage bronchique a été observée spécifiquement dans les groupes de cellules pathologiques. Une variabilité de réponse assez importante a toutefois été obtenue dans chaque groupe. Pour conforter ces résultats, et notamment la pertinence des gènes dérégulés, il serait intéressant de mener des études similaires avec d'autres donneurs et/ou avec des PM provenant d'une situation géographique ou météorologique/climatique différente. Des études *in vivo* pourraient aussi être réalisées en utilisant des modèles de souris asthmatiques (e.g. sensibilisées à l'ovalbumine ou aux acariens), et des modèles de souris BPCO (e.g. exposées à la fumée de cigarette ou déficientes en α 1AT). A terme, certains biomarqueurs identifiés pourraient permettre de développer des stratégies de diagnostic à visée préventive.

La deuxième partie de ce travail portait sur l'étude des modifications fonctionnelles et dynamiques des mitochondries en réponse à l'exposition aux PF et aux PUF, sur la lignée épithéliale bronchique humaine BEAS-2B. Nos résultats ont montré une augmentation de la consommation d'O₂ associée à une augmentation de la masse mitochondriale, ainsi qu'une production accentuée de radicaux libres mitochondriaux et l'activation des réponses antioxydantes associées (nrf2-ARE). L'origine de l'augmentation de la masse mitochondriale (mécanisme d'adaptation ou dysfonction mitophagique ?), pourrait être déterminé en étudiant l'effet des PM à faible dose sur la biogenèse mitochondriale et la mitophagie. Des modifications dynamiques caractérisées par une augmentation de l'expression des marqueurs de fusion et de fission particulièrement ont aussi été observées. Afin de confirmer ces résultats et d'évaluer de potentielles modifications morphologiques (e.g. crêtes, densité, volume des mitochondries), il serait intéressant de visualiser des coupes de cellules BEAS-2B exposées selon le même protocole en microscopie électronique. L'observation en microscopie électronique des cellules exposées permettrait également d'évaluer l'internalisation des particules, et notamment des PUF dans les mitochondries à faible dose. Ces modifications métaboliques et dynamiques, survenant à un stade sub-apoptotique, suggèrent que les mitochondries sont des cibles précoces des particules dans les cellules pulmonaires. Ainsi les dysfonctions du métabolisme mitochondrial, facteur de pathogenèse des bronchopneumopathies chroniques, pourrait jouer un rôle clef dans l'initiation ou l'exacerbation de ces pathologies causées par une exposition

à la pollution atmosphérique particulaire. Pour confirmer ces résultats, certains points clefs tels que l'augmentation de la respiration et de la masse mitochondriale ainsi que les modifications dynamiques pourraient être validés sur les modèles d'épithélia différenciés, sains ou pathologiques, utilisés dans la première partie de cette étude, ainsi que sur des modèles *in vivo*.

Les PUF ont déclenché une réactivité biologique plus importante que les PF sur différents points tels que la réaction inflammatoire, la dérégulation de l'expression génique, et les modifications dynamiques des mitochondries. Compte tenu des résultats de cette étude et de ceux décrits dans la littérature, les PUF pourraient largement contribuer aux effets sanitaires causés par les PM_{2.5} (incluant les PF et les PUF). L'intégration des PUF dans les mesures de la qualité de l'air et la mise en place d'une réglementation plus adaptée à leur prise en compte pourraient diminuer l'impact sanitaire démontré de la pollution atmosphérique.

Bibliographie

1. Lelieveld J, Klingmüller K, Pozzer A, Pöschl U, Fnais M, Daiber A, et al. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur Heart J* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 19]; Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/advance-article/doi/10.1093/eurheartj/ehz135/5372326>
2. Egger AnneE. Composition of Earth's Atmosphere | Earth Science [Internet]. Visionlearning. 2003 [cited 2019 Jan 11]. Available from: <https://www.visionlearning.com/en/library/Earth-Science/6/Composition-of-Earths-Atmosphere/107/reading>
3. Brüesch P. The atmosphere of our Earth, of planets of our solar system and of exoplanets [Internet]. ETH Zurich; 2016. Available from: <http://hdl.handle.net/20.500.11850/155401>
4. Makra L. Anthropogenic Air Pollution in Ancient Times. *Toxicol Antiq* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2019 Jan 14]. p. 267–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128153390000184>
5. Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect*. 2004;112:6–8.
6. Pascal M. Analyse des gains en santé de plusieurs scénarios d'amélioration de la qualité de l'air en France continentale. 2016;8.
7. Dockery DW. Health Effects of Particulate Air Pollution. *Ann Epidemiol*. 2009;19:257–63.
8. Survol [Internet]. [cited 2019 Jul 5]. Available from: <http://survol.airparif.fr/observatoire/polluants>
9. Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*. 1994;102:173–9.
10. Levy JI, Hammitt JK, Spengler JD. Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability? *Environ Health Perspect*. 2000;108:109–17.
11. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113:823–39.
12. Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, et al. Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology

Knowledge. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2017 [cited 2019 Aug 1];125. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5933410/>

13. Hama SML, Cordell RL, Kos GPA, Weijers EP, Monks PS. Sub-micron particle number size distribution characteristics at two urban locations in Leicester. *Atmospheric Res.* 2017;194:1–16.

14. Rahman MM, Mazaheri M, Clifford S, Morawska L. Estimate of main local sources to ambient ultrafine particle number concentrations in an urban area. *Atmospheric Res.* 2017;194:178–89.

15. Bahadar Zeb B, Khan Alam K, Armin Sorooshian A, Blaschke T, Ahmad I, Shahid I. On the Morphology and Composition of Particulate Matter in an Urban Environment. *Aerosol Air Qual Res.* 2018;18:1431–47.

16. Sýkorová B, Kucbel M, Raclavský K. Composition of airborne particulate matter in the industrial area versus mountain area. *Perspect Sci.* 2016;7:369–72.

17. Song X, Li J, Shao L, Zheng Q, Zhang D. Inorganic ion chemistry of local particulate matter in a populated city of North China at light, medium, and severe pollution levels. *Sci Total Environ.* 2019;650:566–74.

18. Després V, Huffman JA, Burrows SM, Hoose C, Safatov A, Buryak G, et al. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review. *Tellus B Chem Phys Meteorol.* 2012;64:15598.

19. Fuzzi S, Baltensperger U, Carslaw K, Decesari S, Denier van der Gon H, Facchini MC, et al. Particulate matter, air quality and climate: lessons learned and future needs. *Atmospheric Chem Phys.* 2015;15:8217–99.

20. Viana M, Kuhlbusch TAJ, Querol X, Alastuey A, Harrison RM, Hopke PK, et al. Source apportionment of particulate matter in Europe: A review of methods and results. *J Aerosol Sci.* 2008;39:827–49.

21. Choi J-K, Ban S-J, Kim Y-P, Kim Y-H, Yi S-M, Zoh K-D. Molecular marker characterization and source appointment of particulate matter and its organic aerosols. *Chemosphere.* 2015;134:482–91.

22. Karagulian F, Belis CA, Dora CFC, Prüss-Ustün AM, Bonjour S, Adair-Rohani H, et al. Contributions to cities' ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level. *Atmos Environ.* 2015;120:475–83.

23. Quass U, John AC, Kuhlbusch TAJ. Source Apportionment of Airborne Dust in Germany: Methods and Results. In: Viana M, editor. *Urban Air Qual Eur* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cited 2019 Feb 5]. p. 195–218. Available from: http://link.springer.com/10.1007/698_2012_182

24. Belis CA, Karagulian F, Larsen BR, Hopke PK. Critical review and meta-analysis of ambient particulate matter source apportionment using receptor models in Europe. *Atmos Environ.* 2013;69:94–108.

25. Tsai M-Y, Hoek G, Eeftens M, de Hoogh K, Beelen R, Beregszászi T, et al. Spatial variation of PM elemental composition between and within 20 European study areas — Results of the ESCAPE project. *Environ Int.* 2015;84:181–92.
26. Borgie M, Dagher Z, Ledoux F, Verdin A, Cazier F, Martin P, et al. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. *Environ Pollut Barking Essex 1987.* 2015;205:250–60.
27. Rodríguez S, Cuevas E. The contributions of “minimum primary emissions” and “new particle formation enhancements” to the particle number concentration in urban air. *J Aerosol Sci.* 2007;38:1207–19.
28. Hama SML, Cordell RL, Monks PS. Quantifying primary and secondary source contributions to ultrafine particles in the UK urban background. *Atmos Environ.* 2017;166:62–78.
29. Brines M, Dall’Osto M, Amato F, Cruz Minguillón M, Karanasiou A, Alastuey A, et al. Vertical and horizontal variability of PM₁₀ source contributions in Barcelona during SAPUSS. *Atmospheric Chem Phys.* 2016;16:6785–804.
30. Venecek MA, Yu X, Kleeman MJ. Ultrafine Particulate Matter Source Contributions across the Continental United States. *Atmospheric Chem Phys Discuss.* 2018;1–26.
31. Mirabelli MC, Vaidyanathan A, Flanders WD, Qin X, Garbe P. Outdoor PM_{2.5}, Ambient Air Temperature, and Asthma Symptoms in the Past 14 Days among Adults with Active Asthma. *Environ Health Perspect.* 2016;124:1882–90.
32. Dauchet L, Hulo S, Cherot-Kornobis N, Matran R, Amouyel P, Edmé J-L, et al. Short-term exposure to air pollution: Associations with lung function and inflammatory markers in non-smoking, healthy adults. *Environ Int.* 2018;121:610–9.
33. Salimi F, Morgan G, Rolfe M, Samoli E, Cowie CT, Hanigan I, et al. Long-term exposure to low concentrations of air pollutants and hospitalisation for respiratory diseases: A prospective cohort study in Australia. *Environ Int.* 2018;121:415–20.
34. Adam D, Perotin J-M, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Régénération de l’épithélium des voies aériennes. *Rev Mal Respir.* 2014;31:300–11.
35. Fahy, Dickey. Airway Mucus Function and Dysfunction [Internet]. [cited 2019 Apr 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048736/>
36. Leslie KO, Wick MR. Lung Anatomy. *Pract Pulm Pathol Diagn Approach* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 Apr 5]. p. 1-14.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323442848000016>
37. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* 2014;16:27–35.

38. Lumb AB, Horner D. Chapter 25 - Pulmonary Physiology. In: Hemmings HC, Egan TD, editors. *Pharmacol Physiol Anesth* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2013 [cited 2019 Apr 5]. p. 445–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437716795000259>
39. Provoost S, Maes T, Pauwels NS, Berghe TV, Vandenabeele P, Lambrecht BN, et al. NLRP3/Caspase-1–Independent IL-1 β Production Mediates Diesel Exhaust Particle-Induced Pulmonary Inflammation. *J Immunol*. 2011;187:3331–7.
40. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
41. Vallath S, Hynds RE, Succony L, Janes SM, Giangreco A. Targeting EGFR signalling in chronic lung disease: therapeutic challenges and opportunities. *Eur Respir J*. 2014;44:513–22.
42. Grove KCD, Provoost S, Brusselle GG, Joos GF, Maes T. Insights in particulate matter-induced allergic airway inflammation: Focus on the epithelium. *Clin Exp Allergy*. 2018;48:773–86.
43. Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman J-P, Sibille Y. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J*. 2001;18:571–88.
44. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000;321:424.
45. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:211–21.
46. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9:7204–18.
47. Puchelle E, Zahm J-M, Tournier J-M, Coraux C. Airway Epithelial Repair, Regeneration, and Remodeling after Injury in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:726–33.
48. Sears MR. Trends in the Prevalence of Asthma. *CHEST*. 2014;145:219–25.
49. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *The Lancet*. 2013;382:1360–72.
50. Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallof J, Keil U, Mitchell E, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62:758–66.
51. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primer*. 2015;1:15025.
52. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18:716–25.
53. National Asthma Education, and Prevention Program. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. 2007;440.

54. Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld J-C, Levitt RC, et al. Interleukin-9 Upregulates Mucus Expression in the Airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22:649–56.
55. Seibold MA. Interleukin-13 Stimulation Reveals the Cellular and Functional Plasticity of the Airway Epithelium. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15:S98–102.
56. Lumb. Sci-Hub | Airways Disease. *Nunn's Applied Respiratory Physiology*, 389–405.e2 | 10.1016/B978-0-7020-6294-0.00027-7 [Internet]. [cited 2019 Apr 16]. Available from: <https://sci-hub.tw/10.1016/B978-0-7020-6294-0.00027-7>
57. Pradaliere A. Late-Phase Reaction in Asthma Basic Mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993;101:322–5.
58. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. 1998;339:1194–200.
59. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1720–45.
60. Aoshiba K, Nagai A. Differences in Airway Remodeling Between Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;27:035–44.
61. Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 2015;36:189–95.
62. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med*. 2013;19:977–9.
63. Préfontaine D, Nadigel J, Chouiali F, Audusseau S, Semlali A, Chakir J, et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:752–4.
64. Shikotra A, Choy DF, Ohri CM, Doran E, Butler C, Hargadon B, et al. Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:104-111.e9.
65. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, Meng Q, Mallett K, Cousins D, et al. Thymic Stromal Lymphopoietin Expression Is Increased in Asthmatic Airways and Correlates with Expression of Th2-Attracting Chemokines and Disease Severity. *J Immunol*. 2005;174:8183–90.
66. Mitchell PD, O'Byrne PM. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest*. 2017;151:1338–44.
67. Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in Severe Asthma. Where Do We Stand? *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190:1094–101.
68. Fricker M, Gibson PG. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. *Eur Respir J*. 2017;50:1700196.

69. Fuhrman C, Delmas M-C. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Rev Mal Respir.* 2010;27:160–8.
70. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Assembly. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2019.
71. Misra. COPD Guidelines: A Review of the 2018 GOLD Report - Mayo Clinic Proceedings [Internet]. [cited 2019 Apr 7]. Available from: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(18\)30409-9/fulltext](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(18)30409-9/fulltext)
72. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primer.* 2015;15076.
73. Mornex J-F. Alpha-1 antitrypsin deficiency 50 years later. 2014;10.
74. Rabe KF, Watz H. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet.* 2017;389:1931–40.
75. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1967–76.
76. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 2009;360:2445–54.
77. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest.* 2007;117:3551–62.
78. Lane N, Robins RA, Corne J, Fairclough L. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clin Sci.* 2010;119:75–86.
79. Wrench C, Belchamber KBR, Bercusson A, Shah A, Barnes PJ, Armstrong-James D, et al. Reduced Clearance of Fungal Spores by Chronic Obstructive Pulmonary Disease GM-CSF– and M-CSF–derived Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58:271–3.
80. Bewley MA, Preston JA, Mohasin M, Marriott HM, Budd RC, Swales J, et al. Impaired Mitochondrial Microbicidal Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196:845–55.
81. Kapellos TS, Bassler K, Aschenbrenner AC, Fujii W, Schultze JL. Dysregulated Functions of Lung Macrophage Populations in COPD. *J. Immunol. Res.* 2018
82. Jubrail J, Kurian N, Niedergang F. Macrophage phagocytosis cracking the defect code in COPD. *Biomed J.* 2017;40:305–12.
83. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:451–64.

84. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:636–45.
85. Putcha N, Drummond MB, Wise RA, Hansel NN. Comorbidities and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Influence on Outcomes, and Management. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015;36:575–91.
86. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci*. 2017;131:1541–58.
87. Lumb AB. Airways Disease. *Nunns Appl Respir Physiol* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 Jun 21]. p. 389-405.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702062940000277>
88. To T, Zhu J, Larsen K, Simatovic J, Feldman L, Ryckman K, et al. Progression from Asthma to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Is Air Pollution a Risk Factor? *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:429–38.
89. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552:335–44.
90. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2013;6:19.
91. Kensler T. Sci-Hub | Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 89–116 2007
92. Cloonan SM, Choi AMK. Mitochondria in lung disease. *J Clin Invest*. 2016;126:809–20.
93. Schroedl C, McClintock DS, Budinger GRS, Chandel NS. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 α requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:L922–31.
94. Emerling BM, Plataniias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Hypoxia Signaling. *Mol Cell Biol*. 2005;25:4853–62.
95. Meyer A, Laverny G, Bernardi L, Charles AL, Alsaleh G, Pottecher J, et al. Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 24];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5916961/>
96. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469:221–5.
97. Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, et al. Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:769–80.

98. Sanders SP, Zweier JL, Harrison SJ, Trush MA, Rembish SJ, Liu MC. Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1725–33.
99. Lansing MW, Ahmed A, Cortes A, Sielczak MW, Wanner A, Abraham WMA. Oxygen Radicals Contribute to Antigen-induced Airway Hyperresponsiveness in Conscious Sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:321–6.
100. Hulsmann AR, Raatgeep HR, den Hollander JC, Stijnen T, Saxena PR, Kerrebijn KF, et al. Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:519–25.
101. Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Saavedra-Molina A, Kurosky A, Sur S, Boldogh I. Mitochondrial Dysfunction Increases Allergic Airway Inflammation. *J Immunol.* 2009;183:5379–87.
102. Mabalirajan U, Dinda AK, Kumar S, Roshan R, Gupta P, Sharma SK, et al. Mitochondrial Structural Changes and Dysfunction Are Associated with Experimental Allergic Asthma. *J Immunol.* 2008;181:3540–8.
103. Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolese M, Paradies G. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;509:435–8.
104. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* 2016;23:303–14.
105. Michaeloudes C, Chang P-J, Petrou M, Chung KF. Transforming Growth Factor- β and Nuclear Factor E2-related Factor 2 Regulate Antioxidant Responses in Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:894–903.
106. Reddy PH. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Asthma: Implications for Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics. *Pharmaceuticals.* 2011;4:429–56.
107. Yamada K, Asai K, Nagayasu F, Sato K, Ijiri N, Yoshii N, et al. Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking. *BMC Pulm Med.* 2016
108. Hoffmann RF, Zarrintan S, Brandenburg SM, Kol A, de Bruin HG, Jafari S, et al. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respir Res.* 2013;14:97.
109. Kao CC, Hsu JW-C, Bandi V, Hanania NA, Kheradmand F, Jahoor F. Glucose and pyruvate metabolism in severe chronic obstructive pulmonary disease. *J Appl Physiol.* 2011;112:42–7.

110. Tilokani. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms | Essays in Biochemistry [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 25]. Available from: <http://essays.biochemistry.org/content/62/3/341>
111. Sauvanet C, Arnauné-Pelloquin L, David C, Belenguer P, Rojo M. Dynamique et morphologie mitochondriales: Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *médecine/sciences*. 2010;26:823–9.
112. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*. 2012;337:1062–5.
113. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004;18:357–68.
114. Scarpulla RC. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:321–34.
115. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98:115–24.
116. Lennon FE, Salgia R. Mitochondrial dynamics: biology and therapy in lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014;23:675–92.
117. Li J, Dai A, Hu R, Zhu L, Tan S. Positive correlation between PPAR γ /PGC-1 α and γ -GCS in lungs of rats and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2010;42:603–14.
118. Hara H, Kuwano K, Araya J. Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*. 2018;7:86.
119. Ahmad T, Sundar IK, Lerner CA, Gerloff J, Tormos AM, Yao H, et al. Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J*. 2015;29:2912–29.
120. Lerner CA, Sundar IK, Rahman I. Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;81:294–306.
121. Roth M, Black JL. An imbalance in C/EBPs and increased mitochondrial activity in asthmatic airway smooth muscle cells: novel targets in asthma therapy? *Br J Pharmacol*. 2009;157:334–41.
122. Hanigan IC, Rolfe MI, Knibbs LD, Salimi F, Cowie CT, Heyworth J, et al. All-cause mortality and long-term exposure to low level air pollution in the “45 and up study” cohort, Sydney, Australia, 2006-2015. *Environ Int*. 2019;126:762–70.
123. Vodonos A, Awad YA, Schwartz J. The concentration-response between long-term PM_{2.5} exposure and mortality; A meta-regression approach. *Environ Res*. 2018;166:677–89.

124. Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet*. 2017;389:1907–18.
125. Xue X, Chen J, Sun B, Zhou B, Li X. Temporal trends in respiratory mortality and short-term effects of air pollutants in Shenyang, China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018;25:11468–79.
126. DeVries R, Kriebel D, Sama S. Outdoor Air Pollution and COPD-Related Emergency Department Visits, Hospital Admissions, and Mortality: A Meta-Analysis. *COPD*. 2017;14:113–21.
127. Zhang R, Liu G, Jiang Y, Li G, Pan Y, Wang Y, et al. Acute Effects of Particulate Air Pollution on Ischemic Stroke and Hemorrhagic Stroke Mortality. *Front Neurol*. 2018
128. Liang H, Qiu H, Tian L. Short-term effects of fine particulate matter on acute myocardial infarction mortality and years of life lost: A time series study in Hong Kong. *Sci Total Environ*. 2018;615:558–63.
129. Achilleos S, Kioumourtzoglou M-A, Wu C-D, Schwartz JD, Koutrakis P, Papatheodorou SI. Acute effects of fine particulate matter constituents on mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Environ Int*. 2017;109:89–100.
130. Zanobetti A, Schwartz J, Samoli E, Gryparis A, Touloumi G, Peacock J, et al. The temporal pattern of respiratory and heart disease mortality in response to air pollution. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1188–93.
131. Alessandrini ER, Stafoggia M, Faustini A, Berti G, Canova C, De Togni A, et al. Association Between Short-Term Exposure to PM_{2.5} and PM₁₀ and Mortality in Susceptible Subgroups: A Multisite Case-Crossover Analysis of Individual Effect Modifiers. *Am J Epidemiol*. 2016;184:744–54.
132. Yorifuji T, Kashima S, Doi H. Acute exposure to fine and coarse particulate matter and infant mortality in Tokyo, Japan (2002-2013). *Sci Total Environ*. 2016;551–552:66–72.
133. Kim H, Kim H, Park Y, Lee J-T. Assessment of temporal variation for the risk of particulate matters on asthma hospitalization. *Environ Res*. 2017;156:542–50.
134. Qiu Hong, Yu Ignatius Tak-sun, Tian Linwei, Wang Xiaorong, Tse Lap Ah, Tam Wilson, et al. Effects of Coarse Particulate Matter on Emergency Hospital Admissions for Respiratory Diseases: A Time-Series Analysis in Hong Kong. *Environ Health Perspect*. 2012;120:572–6.
135. Heinrich J, Schikowski T. COPD Patients as Vulnerable Subpopulation for Exposure to Ambient Air Pollution. *Curr Environ Health Rep*. 2018;5:70–6.
136. Li J, Sun S, Tang R, Qiu H, Huang Q, Mason TG, et al. Major air pollutants and risk of COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:3079–91.

137. Gao N, Li C, Ji J, Yang Y, Wang S, Tian X, et al. Short-term effects of ambient air pollution on chronic obstructive pulmonary disease admissions in Beijing, China (2013–2017). *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019;Volume 14:297–309.
138. Croft DP, Zhang W, Lin S, Thurston SW, Hopke PK, Masiol M, et al. The Association between Respiratory Infection and Air Pollution in the Setting of Air Quality Policy and Economic Change. *Ann Am Thorac Soc*. 2019;16:321–30.
139. Zhang D, Tian Y, Zhang Y, Cao Y, Wang Q, Hu Y. Fine Particulate Air Pollution and Hospital Utilization for Upper Respiratory Tract Infections in Beijing, China. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:533.
140. Gharibvand L, Lawrence Beeson W, Shavlik D, Knutsen R, Ghamsary M, Soret S, et al. The association between ambient fine particulate matter and incident adenocarcinoma subtype of lung cancer. *Environ Health*. 2017
141. Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, et al. Outdoor Particulate Matter Exposure and Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect [Internet]*. 2014 [cited 2019 Jan 8]; Available from: <http://ehp.niehs.nih.gov/1408092>
142. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013;14:813–22.
143. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi FE, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. 2013;14:1262–3.
144. Anderson HR, Favarato G, Atkinson RW. Long-term exposure to air pollution and the incidence of asthma: meta-analysis of cohort studies. *Air Qual Atmosphere Health*. 2013;6:47–56.
145. Ai S, Qian ZM, Guo Y, Yang Y, Rolling CA, Liu E, et al. Long-term exposure to ambient fine particles associated with asthma: A cross-sectional study among older adults in six low- and middle-income countries. *Environ Res*. 2019;168:141–5.
146. Weichenthal S, Bai L, Hatzopoulou M, Van Ryswyk K, Kwong JC, Jerrett M, et al. Long-term exposure to ambient ultrafine particles and respiratory disease incidence in Toronto, Canada: a cohort study. *Environ Health Glob Access Sci Source*. 2017;16:64.
147. Wang C, Xu J, Yang L, Xu Y, Zhang X, Bai C, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study. *Lancet Lond Engl*. 2018;391:1706–17.
148. Atkinson RW, Carey IM, Kent AJ, van Staa TP, Anderson HR, Cook DG. Long-term exposure to outdoor air pollution and the incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a national English cohort. *Occup Environ Med*. 2015;72:42–8.

149. Guo C, Zhang Z, Lau AKH, Lin CQ, Chuang YC, Chan J, et al. Effect of long-term exposure to fine particulate matter on lung function decline and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Taiwan: a longitudinal, cohort study. *Lancet Planet Health*. 2018;2:e114–25.
150. Schikowski T, Mills IC, Anderson HR, Cohen A, Hansell A, Kauffmann F, et al. Ambient air pollution: a cause of COPD? *Eur Respir J*. 2014;43:250–63.
151. Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Koletzko S, Krämer U, et al. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1331–7.
152. Brauer M, Hoek G, Smit HA, Jongste JC de, Gerritsen J, Postma DS, et al. Air pollution and development of asthma, allergy and infections in a birth cohort. *Eur Respir J*. 2007;29:879–88.
153. Patel MM, Quinn JW, Jung KH, Hoepner L, Diaz D, Perzanowski M, et al. Traffic density and stationary sources of air pollution associated with wheeze, asthma, and immunoglobulin E from birth to age 5 years among New York City children. *Environ Res*. 2011;111:1222–9.
154. Zhang F, Krafft T, Ye B, Zhang F, Zhang J, Luo H, et al. The lag effects and seasonal differences of air pollutants on allergic rhinitis in Beijing. *Sci Total Environ*. 2013;442:172–6.
155. Seeni I, Ha S, Nobles C, Liu D, Sherman S, Mendola P. Air pollution exposure during pregnancy: maternal asthma and neonatal respiratory outcomes. *Ann Epidemiol*. 2018;28:612-618.e4.
156. Lavigne E, Donelle J, Hatzopoulou M, Van Ryswyk K, van Donkelaar A, Martin RV, et al. Spatiotemporal Variations in Ambient Ultrafine Particles and the Incidence of Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019.
157. Leon Hsu H-H, Mathilda Chiu Y-H, Coull BA, Kloog I, Schwartz J, Lee A, et al. Prenatal Particulate Air Pollution and Asthma Onset in Urban Children. Identifying Sensitive Windows and Sex Differences. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1052–9.
158. Lee A, Leon Hsu H-H, Mathilda Chiu Y-H, Bose S, Rosa MJ, Kloog I, et al. Prenatal fine particulate exposure and early childhood asthma: Effect of maternal stress and fetal sex. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1880–6.
159. Percy Z, DeFranco E, Xu F, Hall ES, Haynes EN, Jones D, et al. Trimester specific PM_{2.5} exposure and fetal growth in Ohio, 2007-2010. *Environ Res*. 2019;171:111–8.
160. Commission d'enquête du sénat. rapport d'enquête sur le coût économique et financier de la pollution de l'air [Internet]. Sénat; 2015. Report No.: 610. Available from: <http://www.senat.fr/rap/r14-610-1/r14-610-11.pdf>
161. Upadhyay S, Palmberg L. Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol Sci*. 2018;164:21–30.

162. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech.* 2008;1:213–20.
163. Song C-Q, Wang D, Jiang T, O'Connor K, Tang Q, Cai L, et al. In Vivo Genome Editing Partially Restores Alpha1-Antitrypsin in a Murine Model of AAT Deficiency. *Hum Gene Ther.* 2018;29:853–60.
164. Garcia-Canton C, Minet E, Anadon A, Meredith C. Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol In Vitro.* 2013;27:1719–27.
165. Courcot E, Leclerc J, Lafitte J-J, Mensier E, Jaillard S, Gosset P, et al. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2012;40:1953–65.
166. Heijink IH, Brandenburg SM, Noordhoek JA, Postma DS, Slebos D-J, Oosterhout AJM van. Characterisation of cell adhesion in airway epithelial cell types using electric cell–substrate impedance sensing. *Eur Respir J.* 2010;35:894–903.
167. Rayner RE, Makena P, Prasad GL, Cormet-Boyaka E. Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Sci Rep.* 2019;9:500.
168. Pezzulo AA, Starner TD, Scheetz TE, Traver GL, Tilley AE, Harvey B-G, et al. The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300:L25–31.
169. Ghio AJ, Dailey LA, Soukup JM, Stonehuerner J, Richards JH, Devlin RB. Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:25.
170. Fröhlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *Int J Mol Sci.* 2014;15:4795–822.
171. Hofmann W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *J Aerosol Sci.* 2011;42:693–724.
172. US EPA O. Particle Pollution Exposure [Internet]. US EPA. 2014 [cited 2019 May 9]. Available from: <https://www.epa.gov/pmcourse/particle-pollution-exposure>
173. Rissler J, Gudmundsson A, Nicklasson H, Swietlicki E, Wollmer P, Löndahl J. Deposition efficiency of inhaled particles (15-5000 nm) related to breathing pattern and lung function: an experimental study in healthy children and adults. *Part Fibre Toxicol.* 2017
174. Heyder J. Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1:315–20.

175. Chalupa David C, Morrow Paul E, Oberdörster Günter, Utell Mark J, Frampton Mark W. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Perspect.* 2004;112:879–82.
176. Löndahl J, Swietlicki E, Rissler J, Bengtsson A, Boman C, Blomberg A, et al. Experimental determination of the respiratory tract deposition of diesel combustion particles in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Part Fibre Toxicol. 2012;9:30.
177. Möller W, Felten K, Sommerer K, Scheuch G, Meyer G, Meyer P, et al. Deposition, Retention, and Translocation of Ultrafine Particles from the Central Airways and Lung Periphery. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:426–32.
178. León-Mejía G, Machado MN, Okuro RT, Silva LFO, Telles C, Dias J, et al. Intratracheal instillation of coal and coal fly ash particles in mice induces DNA damage and translocation of metals to extrapulmonary tissues. *Sci Total Environ.* 2018;625:589–99.
179. Lundborg M, Dahlén S-E, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, et al. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res.* 2006;100:197–204.
180. Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222:141–51.
181. Øvrevik J, Refsnes M, Låg M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules.* 2015;5:1399–440.
182. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Verbruggen A, Nemery B. Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1665–8.
183. Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Möller W, Behnke-Semmler M, et al. Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol.* 2006;18:733–40.
184. Nemmar A., Hoet P.H.M., Vanquickenborne B., Dinsdale D., Thomeer M., Hoylaerts M.F., et al. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation.* 2002;105:411–4.
185. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol.* 2004;16:437–45.
186. Nemmar A, Hamoir J, Nemery B, Gustin P. Evaluation of particle translocation across the alveolo-capillary barrier in isolated perfused rabbit lung model. *Toxicology.* 2005;208:105–13.

187. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. *Clin Immunol.* 2003;109:250–65.
188. Leclercq B, Happillon M, Antherieu S, Hardy EM, Alleman LY, Grova N, et al. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. 2016;218:1074–88.
189. Balakrishna S, Lomnicki S, McAvey KM, Cole RB, Dellinger B, Cormier SA. Environmentally persistent free radicals amplify ultrafine particle mediated cellular oxidative stress and cytotoxicity. *Part Fibre Toxicol.* 2009;6:11.
190. Wang J, Huang J, Wang L, Chen C, Yang D, Jin M, et al. Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROSMAPK- NF- κ B signaling pathway. *J Thorac Dis.* 2017;9:4398-4412–4412.
191. Fernandes S, Mazzoli-Rocha F. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol Toxicol.*
192. Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, et al. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:519–28.
193. de Oliveira AAF, de Oliveira TF, Dias MF, Medeiros MHG, Di Mascio P, Veras M, et al. Genotoxic and epigenotoxic effects in mice exposed to concentrated ambient fine particulate matter (PM2.5) from São Paulo city, Brazil. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15:40.
194. Yan Z, Jin Y, An Z, Liu Y, Samet JM, Wu W. Inflammatory cell signaling following exposures to particulate matter and ozone. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 2016;1860:2826–34.
195. Zhao C, Liao J, Chu W, Wang S, Yang T, Tao Y, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. *Inhal Toxicol.* 2012;24:918–27.
196. Hirota JA, Hirota SA, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Beck PL, et al. The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1116-1125.e6.
197. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:1194-1204.e2.
198. Yanagisawa R, Takano H, Inoue K -i, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, et al. Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:386–95.
199. Zhang X, Zhong W, Meng Q, Lin Q, Fang C, Huang X, et al. Ambient PM2.5 exposure exacerbates severity of allergic asthma in previously sensitized mice. *J Asthma.* 2015;52:785–94.

200. Matthews NC, Pfeffer PE, Mann EH, Kelly FJ, Corrigan CJ, Hawrylowicz CM, et al. Urban Particulate Matter–Activated Human Dendritic Cells Induce the Expansion of Potent Inflammatory Th1, Th2, and Th17 Effector Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;54:250–62.
201. Grove KCD, Provoost S, Braun H, Blomme EE, Teufelberger AR, Krysko O, et al. IL-33 signalling contributes to pollutant-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2018;48:1665–75.
202. Ogino K, Nagaoka K, Okuda T, Oka A, Kubo M, Eguchi E, et al. PM_{2.5}-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice. *Environ Toxicol*. 2017;32:1047–54.
203. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:499–507.
204. Leclercq B, Kluza J, Antherieu S, Sotty J, Alleman LY, Perdrix E, et al. Air pollution-derived PM_{2.5} impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2018;243:1434–49.
205. Liu J, Liang S, Du Z, Zhang J, Sun B, Zhao T, et al. PM_{2.5} aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. *Environ Pollut*. 2019;249:482–90.
206. Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, Kamp DW. Particulate Matter Induces Alveolar Epithelial Cell DNA Damage and Apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:180–7.
207. Jin X, Xue B, Zhou Q, Su R, Li Z. Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM_{2.5} exposure. *J Toxicol Sci*. 2018;43:101–11.
208. Kamdar O, Le W, Zhang J, Ghio AJ, Rosen GD, Upadhyay D. Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium. *FEBS Lett*. 2008;582:3601–6.
209. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003;111:455–60.
210. Winckelmans E, Nawrot TS, Tsamou M, Den Hond E, Baeyens W, Kleinjans J, et al. Transcriptome-wide analyses indicate mitochondrial responses to particulate air pollution exposure. *Environ Health*. 2017;16:87.
211. Hou L, Zhu Z-Z, Zhang X, Nordio F, Bonzini M, Schwartz J, et al. Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study. *Environ Health*. 2010;9:48.
212. Xu Y, Lindh CH, Jönsson BAG, Broberg K, Albin M. Occupational exposure to asphalt mixture during road paving is related to increased mitochondria DNA copy number: a cross-sectional study. *Environ Health*. 2018;17:29.

213. Hou L, Zhang X, Dioni L, Barretta F, Dou C, Zheng Y, et al. Inhalable particulate matter and mitochondrial DNA copy number in highly exposed individuals in Beijing, China: a repeated-measure study. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:17.
214. Humans IWG on the E of CR to. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. International Agency for Research on Cancer; 2010.
215. Hartwig A. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radic Biol Med*. 2013;55:63–72.
216. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicol Sci*. 2015;145:5–15.
217. DeMarini DM. Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis*. 2013;28:485–505.
218. Çakmak G, Ertürk Arı P, Emerce E, Arı A, Odabaşı M, Schins R, et al. Investigation of spatial and temporal variation of particulate matter in vitro genotoxicity and cytotoxicity in relation to the elemental composition. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 23]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571818302596>
219. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:10604–9.
220. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:6823–36.
221. Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, et al. Rapid DNA Methylation Changes after Exposure to Traffic Particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:572–8.
222. Madrigano Jaime, Baccarelli Andrea, Mittleman Murray A., Wright Robert O., Sparrow David, Vokonas Pantel S., et al. Prolonged Exposure to Particulate Pollution, Genes Associated with Glutathione Pathways, and DNA Methylation in a Cohort of Older Men. *Environ Health Perspect*. 2011;119:977–82.
223. Tarantini Letizia, Bonzini Matteo, Apostoli Pietro, Pegoraro Valeria, Bollati Valentina, Marinelli Barbara, et al. Effects of Particulate Matter on Genomic DNA Methylation Content and iNOS Promoter Methylation. *Environ Health Perspect*. 2009;117:217–22.
224. Ji H, Khurana Hershey GK. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129:33–41.
225. Leclercq B, Platel A, Antherieu S, Alleman LY, Hardy EM, Perdrix E, et al. Genetic and epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM_{2.5}. *Environ Pollut*. 2017;230:163–77.

226. Lange NE, Sordillo J, Tarantini L, Bollati V, Sparrow D, Vokonas P, et al. Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study. *BMJ Open*. 2012;2:e001231.
227. Soberanes S, Gonzalez A, Urich D, Chiarella SE, Radigan KA, Osornio-Vargas A, et al. Particulate matter Air Pollution induces hypermethylation of the p16 promoter Via a mitochondrial ROS-JNK-DNMT1 pathway. *Sci Rep*. 2012;2:275.
228. Zhou W, Tian D, He J, Wang Y, Zhang L, Cui L, et al. Repeated PM_{2.5} exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget*. 2016;7:20691–703.
229. Breton Carrie V., Salam Muhammad T., Wang Xinhui, Byun Hyang-Min, Siegmund Kimberly D., Gilliland Frank D. Particulate Matter, DNA Methylation in Nitric Oxide Synthase, and Childhood Respiratory Disease. *Environ Health Perspect*. 2012;120:1320–6.
230. Chen R, Qiao L, Li H, Zhao Y, Zhang Y, Xu W, et al. Fine Particulate Matter Constituents, Nitric Oxide Synthase DNA Methylation and Exhaled Nitric Oxide. *Environ Sci Technol*. 2015;49:11859–65.
231. Lepeule J, Bind M-AC, Baccarelli AA, Koutrakis P, Tarantini L, Litonjua A, et al. Epigenetic Influences on Associations between Air Pollutants and Lung Function in Elderly Men: The Normative Aging Study. *Environ Health Perspect*. 2014;122:566–72.
232. Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, et al. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:392–6.
233. Szulakowski P, Crowther AL, Jiménez LA, Donaldson K, Mayer RR, Leonard TB, et al. The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:41–50.
234. Ji X, Yue H, Ku T, Zhang Y, Yun Y, Li G, et al. Histone modification in the lung injury and recovery of mice in response to PM_{2.5} exposure. *Chemosphere*. 2019;220:127–36.
235. Zheng Y, Sanchez-Guerra M, Zhang Z, Joyce BT, Zhong J, Kresovich JK, et al. Traffic-derived particulate matter exposure and histone H3 modification: A repeated measures study. *Environ Res*. 2017;153:112–9.
236. Ding R, Jin Y, Liu X, Zhu Z, Zhang Y, Wang T, et al. H3K9 acetylation change patterns in rats after exposure to traffic-related air pollution. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;42:170–5.
237. Liu C, Xu J, Chen Y, Guo X, Zheng Y, Wang Q, et al. Characterization of genome-wide H3K27ac profiles reveals a distinct PM_{2.5}-associated histone modification signature. *Environ Health*. 2015;14:65.

238. Cao D, Bromberg PA, Samet JM. COX-2 Expression Induced by Diesel Particles Involves Chromatin Modification and Degradation of HDAC1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37:232–9.
239. Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2003;284:L533–40.
240. Misra C, Kim S, Shen S, Sioutas C. A high flow rate, very low pressure drop impactor for inertial separation of ultrafine from accumulation mode particles. *J Aerosol Sci.* 2002;5:735–52.
241. André Renoux, Boulaud D. Les aérosols : physique et métrologie [Internet]. 1999 [cited 2019 Jun 3]. Available from: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/54546/meteo_1999_25_65.pdf?sequence=1
242. Mbengue S, Alleman LY, Flament P. Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmospheric Res.* 2014;135–136:35–47.
243. Crenn, Chakraborty, Fronval, Petitprez, Riffault. Fine particles sampled at an urban background site and an industrialized coastal site in Northern France—Part 2: Comparison of offline and online analyses for carbonaceous aerosols: *Aerosol Science and Technology: Vol 52, No 3. Aerosol Sci Technol.* 2017;52:287–99.
244. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47.
245. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. *Methods Enzymol.* 2014
246. Zhou Z, Liu Y, Duan F, Qin M, Wu F, Sheng W, et al. Transcriptomic Analyses of the Biological Effects of Airborne PM_{2.5} Exposure on Human Bronchial Epithelial Cells. *PLOS ONE.* 2015;10:e0138267.
247. Braydich-Stolle LK, Breitner EK, Comfort KK, Schlager JJ, Hussain SM. Dynamic Characteristics of Silver Nanoparticles in Physiological Fluids: Toxicological Implications. *Langmuir.* 2014;30:15309–16.
248. Leclercq B, Alleman LY, Perdrix E, Riffault V, Happillon M, Strecker A, et al. Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: Toxicological perspectives. *Environ Res.* 2017;156:148–57.
249. Greenan R. Optimization of the VITROCELL® Exposure System for In Vitro Toxicity Testing of Diesel Emissions at the Air-Liquid Interface [Internet]. University of Ottawa; 2015 [cited 2019 Aug 5]. Available from: <http://dx.doi.org/10.20381/ruor-3917>
250. Hackett T-L, Singhera GK, Shaheen F, Hayden P, Jackson GR, Hegele RG, et al. Intrinsic Phenotypic Differences of Asthmatic Epithelium and Its Inflammatory

Responses to Respiratory Syncytial Virus and Air Pollution. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:1090–100.

251. Freishtat RJ, Watson AM, Benton AS, Iqbal SF, Pillai DK, Rose MC, et al. Asthmatic Airway Epithelium Is Intrinsically Inflammatory and Mitotically Dyssynchronous. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:863–9.

252. Cantone L, Nordio F, Hou L, Apostoli P, Bonzini M, Tarantini L, et al. Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers. *Environ Health Perspect*. 2011;119:964–9.

253. Mereness JA, Bhattacharya S, Wang Q, Ren Y, Pryhuber GS, Mariani TJ. Type VI collagen promotes lung epithelial cell spreading and wound-closure. *PLOS ONE*. 2018;13:e0209095.

254. Dassah M, Almeida D, Hahn R, Bonaldo P, Worgall S, Hajjar KA. Annexin A2 mediates secretion of collagen VI, pulmonary elasticity and apoptosis of bronchial epithelial cells. *J Cell Sci*. 2014;127:828–44.

255. Mofarrahi M, Sigala I, Vassilakopoulos T, Harel S, Guo Y, Debigare R, et al. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *J Appl Physiol*. 2013;114:1309–18.

256. Jeong D, Ban S, Oh S, Jin Lee S, Yong Park S, Koh YW. Prognostic Significance of EDIL3 Expression and Correlation with Mesenchymal Phenotype and Microvessel Density in Lung Adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2017

257. Lee S-H, Kim D-Y, Jing F, Kim H, Yun C-O, Han D-J, et al. Del-1 overexpression potentiates lung cancer cell proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468:92–8.

258. Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, et al. Levels of Surfactant Proteins A and D and KL-6 Are Elevated in the Induced Sputum of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients: A Sequential Sputum Analysis. *Respiration*. 2011;82:10–8.

259. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential Expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in Carcinomas of Various Sites: An Immunohistochemical Study. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:61–9.

260. Baqir M, Chen C-Z, Martin RJ, Thaikootathil J, Case SR, Minor MN, et al. Cigarette smoke decreases MARCO expression in macrophages: Implication in *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Respir Med*. 2008;102:1604–10.

261. Mancuso P, Canetti C, Gottschalk A, Tithof PK, Peters-Golden M. Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2 γ) protein expression. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287:L497–502.

262. Hallstrand TS, Lai Y, Altemeier WA, Appel CL, Johnson B, Frevert CW, et al. Regulation and Function of Epithelial Secreted Phospholipase A2 Group X in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:42–50.

263. Pniewska E, Pawliczak R. The Involvement of Phospholipases A2 in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators Inflamm.* 2013
264. Hallstrand TS, Altemeier WA, Aitken ML, Henderson WR. Role of Cells and Mediators in Exercise-Induced Bronchoconstriction. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2013;33:313–vii.
265. Hurley BP, McCormick BA. Multiple Roles of Phospholipase A2 during Lung Infection and Inflammation. *Infect Immun.* 2008;76:2259–72.
266. Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, et al. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature.* 1997;390:618–22.
267. Ishihara K, Kuroda A, Sugihara K, Kanai S, Nabe T, Akiba S. Regulation of macrophage differentiation and polarization by group IVC phospholipase A2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416:325–30.
268. Girodet P-O, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E, et al. Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;55:467–75.
269. Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Dual role of YM1+ M2 macrophages in allergic lung inflammation. *Sci Rep.* 2018;8:1–12.
270. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L, Gao P. Macrophage Polarization and Allergic Asthma. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2018;191:1–14.
271. Trischler J, Shiomi T, Turner DL, Sklepkiwicz PL, Goldklang MP, Tanaka KF, et al. Immune Modulation of the T Cell Response in Asthma through Wnt10b. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54:584–93.
272. van de Garde MDB, Martinez FO, Melgert BN, Hylkema MN, Jonkers RE, Hamann J. Chronic Exposure to Glucocorticoids Shapes Gene Expression and Modulates Innate and Adaptive Activation Pathways in Macrophages with Distinct Changes in Leukocyte Attraction. *J Immunol.* 2014;192:1196–208.
273. Strapáčová S, Brenerová P, Krčmář P, Andersson P, van Ede KI, van Duursen MBM, et al. Relative effective potencies of dioxin-like compounds in rodent and human lung cell models. *Toxicology.* 2018;404–405:33–41.
274. Tijet N. The aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol Pharmacol.* 2005.
275. Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Låg M. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:41.
276. Andryšik Z, Vondráček J, Marvanová S, Ciganek M, Neča J, Pěňčíková K, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: The role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2011;714:53–62.

277. Luo Y-H, Kuo Y-C, Tsai M-H, Ho C-C, Tsai H-T, Hsu C-Y, et al. Interleukin-24 as a target cytokine of environmental aryl hydrocarbon receptor agonist exposure in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;324:1–11.
278. Chari R, Lonergan KM, Ng RT, MacAulay C, Lam WL, Lam S. Effect of active smoking on the human bronchial epithelium transcriptome. *BMC Genomics.* 2007;8:297.
279. Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Research* [Internet]. 2016 [cited 2019 Aug 11];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017282/>
280. Bauer AK, Velmurugan K, Xiong K-N, Alexander C-M, Xiong J, Brooks R. Epiregulin is required for lung tumor promotion in a murine two-stage carcinogenesis model. *Mol Carcinog.* 2017;56:94–105.
281. Riese DJ, Cullum RL. Epiregulin: Roles in Normal Physiology and Cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;0:49–56.
282. Vaz M, Rajasekaran S, Potteti HR, Reddy SP. Myeloid-Specific Fos-Related Antigen-1 Regulates Cigarette Smoke–Induced Lung Inflammation, Not Emphysema, in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015;53:125–34.
283. Zhang Q, Kleeberger SR, Reddy SP. DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L427–36.
284. Shimbori C, Bellaye P-S, Xia J, Gauldie J, Ask K, Ramos C, et al. Fibroblast growth factor-1 attenuates TGF- β 1-induced lung fibrosis. *J Pathol.* 2016;240:197–210.
285. Ramos C, Becerril C, Montaña M, García-De-Alba C, Ramírez R, Checa M, et al. FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299:L222–31.
286. Liang G, Song L, Chen Z, Qian Y, Xie J, Zhao L, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism. *Kidney Int.* 2018;93:95–109.
287. Kranenburg AR, Willems-Widyastuti A, Mooi WJ, Saxena PR, Sterk PJ, Boer WI de, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with enhanced bronchial expression of FGF-1, FGF-2, and FGFR-1. *J Pathol.* 2005;206:28–38.
288. MacKenzie B, Korfei M, Henneke I, Sibinska Z, Tian X, Hezel S, et al. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2015;16:83.
289. Yokota H, Goldring MB, Sun HB. CITED2-mediated Regulation of MMP-1 and MMP-13 in Human Chondrocytes under Flow Shear. *J Biol Chem.* 2003;278:47275–80.
290. Kim G-D, Das R, Rao X, Zhong J, Deilluis JA, Ramirez-Bergeron DL, et al. CITED2 Restrains Proinflammatory Macrophage Activation and Response. *Mol Cell Biol.* 2018

291. Kovács M, Németh T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, et al. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med*. 2014;211:1993–2011.
292. Mazzi P, Cavegion E, Lapinet-Vera JA, Lowell CA, Berton G. The Src-family kinases Hck and Fgr regulate early lipopolysaccharide-induced myeloid cell recruitment into the lung and their ability to secrete chemokines. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195:2383–95.
293. Rajagopal J, Carroll TJ, Guseh JS, Bores SA, Blank LJ, Anderson WJ, et al. Wnt7b stimulates embryonic lung growth by coordinately increasing the replication of epithelium and mesenchyme. *Dev Camb Engl*. 2008;135:1625–34.
294. Shu W, Jiang YQ, Lu MM, Morrisey EE. Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development*. 2002;129:4831–42.
295. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;3:735.
296. Volckaert T, Dill E, Campbell A, Tiozzo C, Majka S, Bellusci S, et al. Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury. *J Clin Invest*. 2011;121:4409–19.
297. Königshoff M, Eickelberg O. WNT Signaling in Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:21–31.
298. Ota C, Baarsma HA, Wagner DE, Hilgendorff A, Königshoff M. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol Cell Pediatr*. 2016
299. Kim J-S, Okamoto K, Arima S, Rubin BK. Vasoactive intestinal peptide stimulates mucus secretion, but nitric oxide has no effect on mucus secretion in the ferret trachea. *J Appl Physiol*. 2006;101:486–91.
300. Mullol J, Baraniuk JN, Pitale M, Benfield T, Logun C, Picado C, et al. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces IL-6 and IL-8, but not G-CSF and GM-CSF release from a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides*. 1997;31:119–24.
301. Coles SJ, Said SI, Reid LM. Inhibition by Vasoactive Intestinal Peptide of Glycoconjugate and Lysozyme Secretion by Human Airways in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 1981;124:531–6.
302. Miotto D, Boschetto P, Bononi I, Zeni E, Cavallesco G, Fabbri LM, et al. Vasoactive intestinal peptide receptors in the airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 2004;24:958–63.
303. Chen J, Dai A-G, Fu M-J, Long Z-G, Zhu L-M. [The roles of PPAR-gamma/PGC-1alpha to Nrf2/gamma-GCS-h in lung of guinea pigs with bronchial asthma]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin J Appl Physiol*. 2011;27:225–9.

304. Singh SP, Schragenheim J, Cao J, Abraham NG, Bellner L. PGC-1 alpha Regulates HO-1 Expression, Mitochondrial Dynamics and Biogenesis: Role of Epoxyeicosatrienoic Acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016;125:8–18.
305. Carpagnano GE, Lacedonia D, Malerba M, Palmiotti GA, Cotugno G, Carone M, et al. Analysis of mitochondrial DNA alteration in new phenotype ACOS. *BMC Pulm Med.* 2016;16:31.
306. Wang Y, Zhang M, Li Z, Yue J, Xu M, Zhang Y, et al. Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. *Chemosphere.* 2019;218:577–88.
307. Xue M, Momiji H, Rabbani N, Barker G, Bretschneider T, Shmygol A, et al. Frequency Modulated Translocational Oscillations of Nrf2 Mediate the Antioxidant Response Element Cytoprotective Transcriptional Response. *Antioxid Redox Signal.* 2014;23:613–29.
308. Kapuy O, Papp D, Vellai T, Bánhegyi G, Korcsmáros T. Systems-Level Feedbacks of NRF2 Controlling Autophagy upon Oxidative Stress Response. *Antioxidants.* 2018
309. Xue M, Momiji H, Rabbani N, Bretschneider T, Rand DA, Thornalley PJ. Frequency modulated translocational oscillations of Nrf2, a transcription factor functioning like a wireless sensor. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:669–73.
310. Lavrich KS, Corteselli EM, Wages PA, Bromberg PA, Simmons SO, Gibbs-Flournoy EA, et al. Investigating mitochondrial dysfunction in human lung cells exposed to redox-active PM components. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;342:99–107.
311. Zhong J, Cayir A, Trevisi L, Sanchez-Guerra M, Lin X, Peng C, et al. Traffic-Related Air Pollution, Blood Pressure, and Adaptive Response of Mitochondrial Abundance. *Circulation.* 2016;133:378–87.
312. Malinska D, Szymański J, Patalas-Krawczyk P, Michalska B, Wojtala A, Prill M, et al. Assessment of mitochondrial function following short- and long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product and reference cigarettes. *Food Chem Toxicol.* 2018;115:1–12.
313. Pardo M, Katra I, Schaeur JJ, Rudich Y. Mitochondria-mediated oxidative stress induced by desert dust in rat alveolar macrophages: Desert Dust Damages Mitochondria Function. *GeoHealth.* 2017;1:4–16.
314. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme Oxygenase-1 Regulates Cardiac Mitochondrial Biogenesis via Nrf2-Mediated Transcriptional Control of Nuclear Respiratory Factor-1. *Circ Res.* 2008;103:1232–40.
315. Li R, Kou X, Geng H, Xie J, Yang Z, Zhang Y, et al. Effect of Ambient PM_{2.5} on Lung Mitochondrial Damage and Fusion/Fission Gene Expression in Rats. *Chem Res Toxicol.* 2015;28:408–18.

316. Guo Z, Hong Z, Dong W, Deng C, Zhao R, Xu J, et al. PM2.5-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in the Nasal Mucosa of Rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2017.
317. Nguyen KC, Rippstein P, Tayabali AF, Willmore WG. Mitochondrial Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dot Nanoparticles in Mammalian Hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2015;146:31–42.
318. Lee H-C, Yin P-H, Chi C-W, Wei Y-H. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*. 2002;9:517–26.

Annexes

Résumé

Des études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre les concentrations en particules atmosphériques (PM) et les admissions hospitalières voire la mortalité liée à l'exacerbation de l'asthme et de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Alors que le rôle des PM inhalées dans l'exacerbation voire l'initiation de ces pathologies est avéré, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents sont encore peu connus. Les effets sanitaires décrits semblent être particulièrement causés par les particules les plus fines, du fait de leur capacité de migration dans le poumon profond où la clairance est moins efficace. Alors que plusieurs études expérimentales se sont intéressées à différents aspects de la toxicité des particules fines (PM_{2.5}), peu de données sont disponibles sur la fraction ultrafine PM_{0.1}, plus importante en nombre de particules, et dont la réactivité de surface accroît leur réactivité chimique. Dans cette étude, des cellules épithéliales bronchiques, provenant d'individus sains, de patients asthmatiques ou atteints de BPCO, ont été différenciées *in vitro* pour reconstituer des modèles d'épithélia ciliés et sécrétoires *in vitro*. Ces modèles ont été utilisés pour étudier les voies de signalisations moléculaires, les modifications épigénétiques et la sécrétion de cytokines induites par l'exposition à la fraction fine et ultrafine des PM. De plus, les mitochondries sont des sources majeures d'espèces réactives de l'oxygène endogènes via leur métabolisme oxydatif, et agissent comme des senseurs de dérèglements homéostatiques précoces. Ces organites pourraient jouer un rôle clef dans le maintien du stress oxydant et de l'inflammation induits par les PM, notamment dans le cas de l'initiation/exacerbation des bronchopneumopathies chroniques. Dans ce contexte, des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) ont été exposées à de faibles doses de PM pour caractériser les altérations de la fonction et de la dynamique mitochondriales à un stade sub-apoptotique. Les résultats mis en évidence dans cette étude devraient contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes en cause dans l'initiation et/ou l'exacerbation de bronchopneumopathies chroniques induites par les PM.

Abstract

Epidemiological studies have highlighted an association between ambient particulate matter (PM) level and hospital admissions or even mortality related with exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). While the role of inhaled PM in exacerbating these pathologies has been reported, pathophysiological mechanisms initiating and maintaining airway inflammation are not yet well understood. Reported health issues seems to be mostly caused by finest particles, due to their ability to diffuse deeply in the lungs, where clearance is less effective. Although numerous experimental studies demonstrated the toxicity of fine particles (PM_{2.5}), mainly through oxidative stress-induced airway inflammation, only few studies have paid close attention to the ultrafine fraction (PM_{0.1}), which attains new properties at nanometric scale. Because of its high specific surface area, PM_{0.1} is likely to be more biologically reactive. In this study, *in vitro* assays were conducted, exposing differentiated models of human bronchial epithelial cells (HBEC), from healthy, asthmatic and COPD-diseased donors, to one or three low dose of PM_{0.18-2.5} and PM_{0.18}. Cytotoxicity, extracellular secretion of proinflammatory mediators and gene expression were studied. Furthermore, mitochondrion is a major endogenous source of reactive oxygen species (ROS) through oxidative metabolism, and coordinate many cell survival signaling processes. In this context, alterations in mitochondrial dynamic and function might play a key role in maintaining PM-induced oxidative stress and inflammation within lung cells, especially in case of chronic lung diseases initiation and/or exacerbation. Human bronchial epithelial BEAS-2B cells were also acutely or repeatedly exposed to low doses of fine (PM_{0.18-2.5}) or ultrafine (PM_{0.18}) particles, in order to characterize mitochondrial dynamic and function without massive cell death. Results highlighted in this study should contribute to a better understanding of the mechanisms governing the initiation and/or exacerbation of chronic airway lung diseases induced by air pollution-derived fine and ultra-fine PM.