



HAL
open science

Pollution atmosphérique particulaire : caractérisation physico-chimique et comparaison des effets toxiques des fractions extractible et non-extractible des PM .

Ghidaa Badran

► To cite this version:

Ghidaa Badran. Pollution atmosphérique particulaire : caractérisation physico-chimique et comparaison des effets toxiques des fractions extractible et non-extractible des PM . . Toxicologie. Université du Littoral Côte d'Opale; Université de Lille (2018-..); Conseil National de la Recherche scientifique (Liban), 2019. Français. NNT : 2019DUNK0547 . tel-02883391

HAL Id: tel-02883391

<https://theses.hal.science/tel-02883391>

Submitted on 29 Jun 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.

Thèse en codirection entre
L'Université du Littoral Côte d'Opale,
L'Université de Lille
Et le Conseil National de la Recherche Scientifique (Liban)

En vue de l'obtention du grade de

Docteur

Spécialité : Toxicologie

**Pollution atmosphérique particulaire : caractérisation
physico-chimique et comparaison des effets toxiques des
fractions extractible et non-extractible des PM_{2.5}**

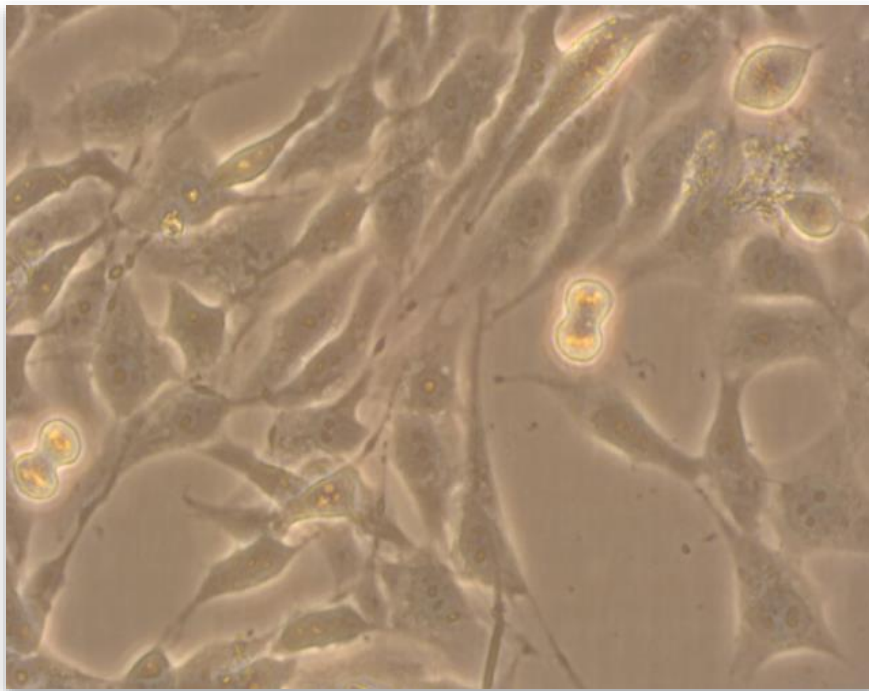
Ghidaa BADRAN

Soutenue le 30 Septembre 2019, devant le Jury d'examen :

Pr. Catherine BOULAND , Université Libre de Bruxelles, Belgique	Rapporteur
Pr. Maurizio GUALTIERI , ENEA, Bologne, Italie	Rapporteur
Dr. Sophie ACHARD , Université Paris Descartes, France	Examineur
Pr. Raphaël DELEPEE , Université de Caen Normandie, France	Examineur
Dr. Imane ABBAS , CNRS Libanais, Liban	Co-encadrant de thèse
Pr. Frédéric LEDOUX , Université du Littoral Côte d'Opale, France	Co-encadrant de thèse
Dr. Anthony VERDIN , Université du Littoral Côte d'Opale, France	Co-encadrant de thèse
Dr. Mohamad ROUMIE , CNRS Libanais, Liban	Co-directeur de thèse
Pr. Guillaume GARÇON , Université de Lille, France	Co-directeur de thèse
Pr. Dominique COURCOT , Université du Littoral Côte d'Opale, France	Directeur de thèse

Remerciements

Aux innocentes victimes de ces travaux de recherche, mon inspiration et source de réussite de cette thèse, envers lesquelles je ne serai jamais capable d'exprimer ma grande gratitude pour leur soutien tout au long de ces années. Malgré le fait de vous avoir intoxiquées et tuées pas mal de fois, je vous aime !!! Mille merci mes petites BEAS-2B !!



Remerciements

C'est peut-être la page la plus difficile à rédiger dans chaque manuscrit. Ici la science n'existe pas, ici c'est mon cœur qui écrit ces quelques mots aux personnes qui étaient là pour moi, et pour ma réussite.

Je tiens, tout d'abord, à remercier l'**ULCO** et le **CNRS-Libanais** pour la bourse, qui m'a permis d'effectuer cette thèse. Je remercie également l'**UCEIV**, le **CNRS-L** et l'**IMPECS** pour le soutien financier nécessaire à la réalisation de l'étude.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je tiens à remercier **Pr. Catherine Bouland** et **Pr. Maurizio Gualtieri**, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également **Dr. Sophie Achard** et **Pr. Raphaël Delépée** pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. Dominique Courcot**, directeur de ma thèse, et du laboratoire (UCEIV-Dunkerque). Merci pour votre accueil et vos infinis conseils. Merci parce que le laboratoire n'a jamais été un endroit seulement pour le travail, mais un endroit plein de rires et de beaux souvenirs avec tous ses membres.

Je tiens à remercier, du fond du cœur **Pr. Guillaume Garçon** pour la co-direction de ce travail. Merci Guillaume pour ta bonne humeur, pour toutes les discussions scientifiques, et les conseils! Sache que sans ton aide, mon travail ne serait pas allé aussi loin! Surtout, un grand merci pour tous les kits cachés que tu m'as offerts pour mener ce travail à bon port!! Merci pour ton temps passé à la paillasse, avec moi, malgré toutes tes occupations. Je t'en suis très reconnaissante !!

Je remercie également **Dr. Mohamad Roumié** - CNRS-L, pour la codirection de cette thèse.

A mes encadrants **Dr. Anthony Verdin**, **Pr. Frédéric Ledoux**, et **Dr. Imane Abbas** que puis-je dire.... même si je rédige des paragraphes pour vous remercier, aucun mot ne sera suffisant pour exprimer toute ma gratitude.

Anthony, tu n'étais pas seulement un encadrant scientifique, mais un vrai supporter!! Les moments les plus difficiles, tu les rendais faciles avec tes mots et tes encouragements. Je te remercie pour toute la force que tu m'as donnée durant ces trois années. Merci pour toutes

les discussions scientifiques, ta disponibilité et surtout ta bonne humeur!! Je te suis incroyablement reconnaissante d'avoir toujours cru en mes capacités!! C'était vraiment un grand plaisir de travailler avec toi !

Frédéric, je te remercie pour ton aide, ton temps, même pendant les weekends et les vacances! Je te remercie pour toutes les réunions enrichissantes scientifiquement! Je te remercie d'avoir supporté toutes mes questions, qui ne se termineront jamais! Merci aussi pour ton soutien quand le moral était bas! J'ai vraiment eu de la chance de travailler avec toi.

Imane, depuis mon stage de master 2, tu m'as aidée à faire le premier pas dans le monde de la recherche! Je te remercie du fond du cœur pour ton temps et ton aide, ton soutien, tes conseils et ta disponibilité.

Je voudrais aussi remercier **Dr. Jean Marc Lo-Guidice**, directeur du laboratoire IMPECS, pour votre accueil chaleureux et votre bonne humeur!

Je tiens également à remercier **Céline Grare**, ingénieur d'étude au laboratoire IMPECS. Céline, merci pour ton aide, ton temps. Je n'oublierai jamais les moments qu'on a vécus avec le western blot, et comme tu le dis toujours: il ne faut surtout pas abandonner, il faut être patient devant un western blot!!!

Je tiens aussi à remercier le Centre Commun de Mesures (CCM) surtout **Dr. Fabrice Cazier** et **Paul Genevray** pour leur aide dans la préparation des extraits organiques et dans les différents dosages chimiques réalisés.

Un remerciement spécial à **Mireille Borgie**, pour ton amitié et tes conseils infinis. C'est vrai qu'on a partagé le même bureau pendant 1 an seulement, mais cela est suffisant pour créer une très belle amitié qui j'espère, restera pour toujours.

Je souhaite également remercier mes amies **Rayan, Khaoula, Lamiaa, Stéphanie**, pour les bons moments, les belles soirées, les rires et les discussions échangées. Merci pour votre amitié !!

Merci à tous les doctorants, amis-collègues de la MREI 1 et 2, **Awa, Rebecca, Murielle, Sara, Clémence, Corentin, Fenjjao, Goaxuan, Tina, Hichem**, pour l'ambiance agréable et les bons moments partagés pendant ces trois années.

Et maintenant c'est votre tour, ma petite famille en France!! **Layal** et **Hadi**, votre amitié est l'une des plus belles choses qui me soit arrivée durant ces années. Layal, tu es la

sœur que j'ai toujours rêvée d'avoir. Hadi, tu n'étais pas seulement un ami, mais un frère! Je vous aime trop!

Enfin, aucune formule ne serait assez pour remercier papa **Hassan** et maman **Ghada**. Sans vos sacrifices, je n'aurais jamais pu être là à accomplir une thèse de doctorat. A mes deux frères, **Mustafa** et **Maher**, merci pour votre soutien malgré la distance. Vous me manquez trop et je vous aime énormément. Un grand Merci pour mon Oncle **Wael**, mon ami et mon grand frère. Merci "khale" pour ton soutien, merci de m'avoir accompagnée et récupérée de l'aéroport pas mal de fois. Merci parce que tu étais à mes côtés quand j'en avais besoin!

Comme dans tout paragraphe de remerciements, il y a sûrement des personnes que j'ai oubliées de mentionner. Ce n'est qu'un oubli sur le papier, dans mon cœur, je ne vous oublie pas!

Valorisations Scientifiques

1. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

1. ABBAS I., **BADRAN G.**, VERDIN A., LEDOUX F., ROUMIE M., LO GUIDICE JM., COURCOT D., GARÇON G. 2018. **Review : Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity.** Environmental Chemistry Letters, 16: 439. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0> (Annexe 1).
2. **BADRAN G (Co-first author).**, ABBAS I (Co-first author)., VERDIN A., LEDOUX F., ROUMIE M., LO GUIDICE JM., COURCOT D., GARÇON G. 2019 **In vitro evaluation of the organic extractable matter from PM2.5 using human 2 bronchial epithelial beas-2b cells: cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, and genotoxicity.** Environmental Research,171: 510-522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>.
3. **BADRAN G.**, LEDOUX F., VERDIN A., ABBAS I., ROUMIE M., GENEVRAY P., LANDKOCZ Y., LO GUIDICE JM., GARÇON G., COURCOT D. **Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions.** Chemosphere, 243, 125440. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125440.
4. **BADRAN G.**, VERDIN A., GRARE C., ACHOUR D., ABBAS I., LEDOUX F., ROUMIE M., LO GUIDICE JM., COURCOT D., GARÇON G., **Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial beas-2b cells.** (Soumis à Environmental Pollution).

2. COMMUNICATIONS ORALES

1. **BADRAN G.**, LEDOUX F., VERDIN A., ABBAS I., GENEVRAY P., CAZIER F., Roumie M., LO GUIDICE JM., GARÇON G., COURCOT D. **Toxicity of quasi-ultrafine and fine particles: focus on the effects of PM2.5 organic extractable and non-extractable matter fractions,** 7th International Symposium on Ultrafine Particles, Brussels, Belgium, 15-16 mai 2019.
2. **BADRAN G.**, VERDIN A., LEDOUX F., ABBAS I., ROUMIE M., COURCOT D, GARCON G. **Pollution Particulaire au Liban : Caractérisation physico-chimique et effets toxiques des PM2.5 collectées en zone urbaine à Beirut,** Journées ARCUS, l'environnement à travers les sciences, Rabat, Maroc, 9- 11 avril 2018.

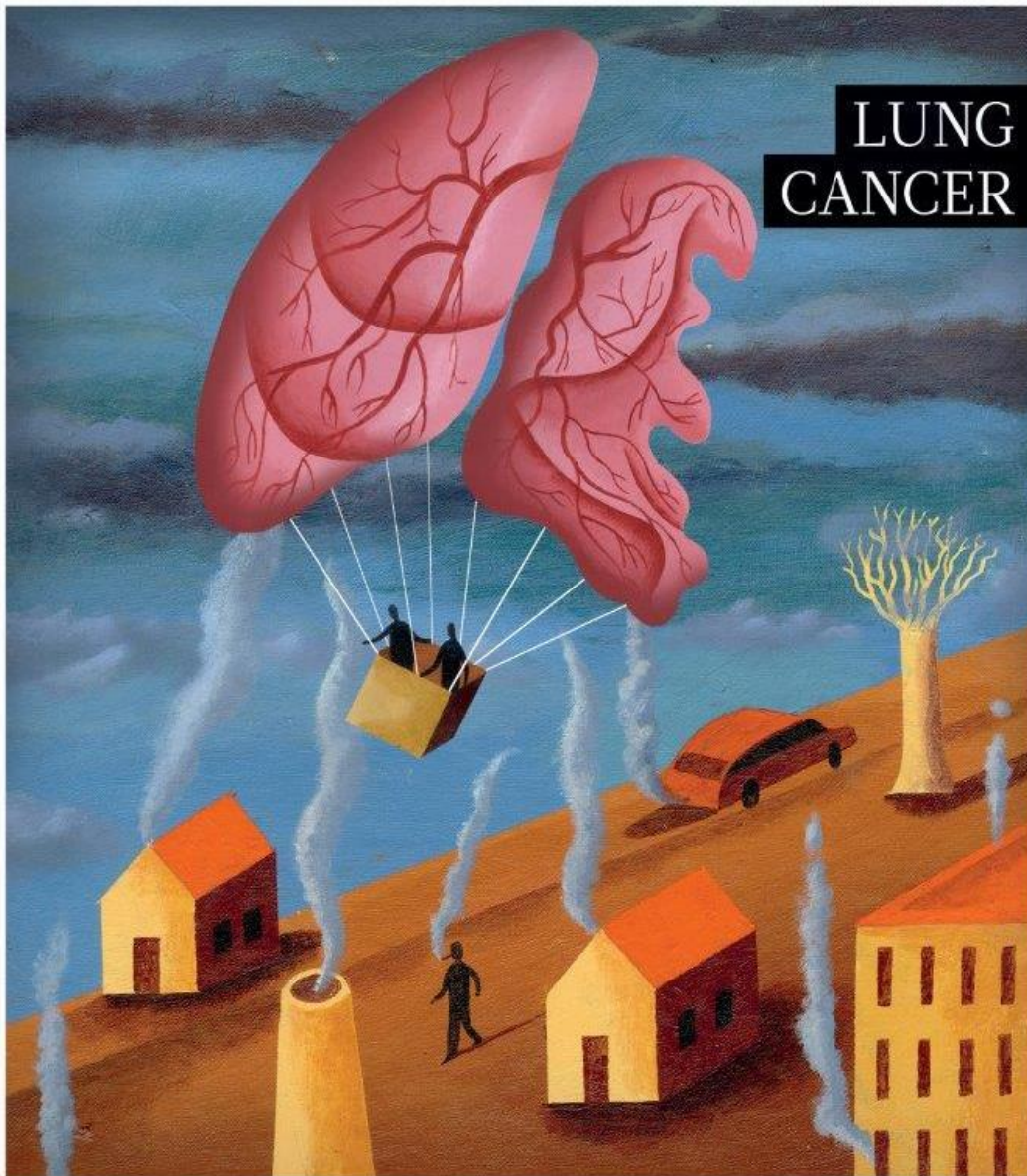
3. **BADRAN G.,** VERDIN V., LEDOUX F., ABBAS I., ROUMIE M., COURCOT D., GARCON G. **Pollution Particulaire au Liban: Etude des effets toxiques de l'extrait organique d'un aérosol atmosphérique particulaire collecté en zone urbaine sur une lignée de cellules pulmonaires humaines (BEAS-2B)**, Congrès Biobeirut 7, Hadath, Liban, 12-15 novembre 2017.

3. COMMUNICATIONS AFFICHEES

1. **BADRAN G.,** VERDIN A., GRARE C., ABBAS I., LEDOUX F., ROUMIE M., LO-GUICIDE JM., COURCOT D and GARÇON G. **Activation of NRF2 and AHR signaling pathways and autophagy by ambient fine and quasi-ultrafine particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells.** 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019), Helsinki, Finland, 8-11 septembre 2019.
2. **BADRAN G.,** LEDOUX F., VERDIN A., ABBAS I., GENEVRAY P., CAZIER F., ROUMIE M., LO-GUIDICE JM, GARÇON G., COURCOT D. **“Caractérisation physico-chimique de particules fines et quasi-ultrafines et effets toxiques dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (Beas-2b)”**. Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie. Lille, France, 27-28 novembre 2018.
3. **BADRAN G.,** VERDIN A., LEDOUX F., ABBAS I., ROUMIE M., COURCOT D., GARCON G. : **«Pollution particulaire au Liban : étude des effets toxiques des extraits organiques d'un aérosol atmosphérique particulaire (PM2.5) sur un modèle in-vitro»**, 3ème Colloque International Francophone en Environnement et Santé, Dunkerque, France, 23-24 octobre 2017.
4. **BADRAN G.,** VERDIN A., LEDOUX F., ABBAS I., ROUMIE M., Guillaume GARCON G., et COURCOT D. **“Air pollution in Lebanon: toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons, derived from atmospheric particulate matter (PM2.5), collected from urban and no-urban sites, on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)”**. The Voltaire Atmospheric chemistry summer school: fundamentals for atmospheric chemistry, Orléans, France, 03-08 juillet 2017.

“I No Longer Know What A Healthy Lung Sounds Like”

Dr. Ganjargal Demberel



Sommaire

INTRODUCTION	23
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART.....	27
PARTIE A : LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE PARTICULAIRE.....	29
1. DÉFINITION DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE	29
2. LES PRINCIPALES SOURCES DE POLLUANTS ATMOSPHERIQUES	29
3. CLASSIFICATION DES POLLUANTS.....	29
4. LES PRINCIPAUX POLLUANTS ATMOSPHERIQUES	30
4.1. Les polluants inorganiques	31
4.1.1. Les NOx	31
4.1.2. Le SO ₂	31
4.1.3. L'Ozone	31
4.1.4. Les éléments majeurs et traces :.....	32
4.2. Les polluants organiques	33
4.2.1. Les composés organiques volatils.....	33
4.2.2. Les polychlorobiphényles (PCB), Dioxines (PCDD) et Furanes (PCDF).....	33
4.2.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.	34
a. Structure des HAP	34
b. Origine des HAP.....	37
c. Formation des dérivés de HAP : les N-HAP et les O-HAP.....	37
d. Concentrations et impact sanitaire des HAP et de leurs dérivés.....	37
e. Impact sanitaire des HAP, N et O-HAP	38
4.3. La matière particulaire	39
4.3.1. Définition et classification.....	39
4.3.2. Composition Chimique des PM.....	39
4.3.3. Impact des particules atmosphériques sur l'environnement	40
f. Impact sur la visibilité	40
g. Impact sur le climat	40
4.3.5. Impact sur la santé	41
5. RÉGLEMENTATIONS ET RECOMMANDATIONS	41
PARTIE B : IMPACT DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES SUR LA SANTE HUMAINE.	43
1. ETUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES SUR L'IMPACT DES PM	43
2. PARTICULES ATMOSPHERIQUES ET SYSTÈME RESPIRATOIRE HUMAIN	44
2.1. Anatomie du système respiratoire humain	44
2.2. Interaction des PM avec le système respiratoire	45
2.3. Biotransformation des composés organiques adsorbés aux PM.....	46
2.3.1. La voie du récepteur aryl hydrocarboné (récepteur AhR).....	47
2.3.2. Bioactivation des HAP.....	49
3. PRINCIPAUX MÉCANISMES DÉCRITS DANS LA TOXICITÉ DES PM.....	50
3.1. Le stress oxydant cellulaire	50
3.1.1. Définition du stress oxydant cellulaire.....	50
3.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène.....	52
3.1.3. Le système de défense non-enzymatique.	52
3.1.4. Le système de défense enzymatique.	52
4. LA VOIE Nrf2 : DÉFENSE ENZYMATIQUE CONTRE LES STRESS OXYDANT.....	53
5. DOMMAGES CELLULAIRES CAUSÉS PAR LES ERO.....	55

5.1.	Oxydation des protéines	55
5.2.	Peroxydation des lipides.....	55
5.3.	Domages à l'ADN.....	56
6.	INTERACTION ENTRE LES VOIE AHR ET NRF2.....	58
7.	INFLAMMATION.....	59
8.	AHR, NRF2 ET INFLAMMATION	61
9.	LES MODALITÉS DE LA MORT CELLULAIRE	63
9.1.	La nécrose :	63
9.2.	L'apoptose :.....	63
9.3.	L'autophagie cellulaire.....	65
9.3.1.	La signalisation moléculaire de l'autophagie.....	66
a.	L'initiation :.....	66
b.	L'élongation :	69
c.	La fusion de l'autophagosome avec le lysosome.....	70
9.3.2.	Interaction entre les voies AhR-Nrf2 et autophagie.....	70
9.3.3.	PM _{2,5} et apoptose et autophagie.....	71
	PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE	75
	CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....	83
	PARTIE A: SITE D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES.....	83
1.	SITE D'ÉTUDE	83
2.	ECHANTILLONNAGE	84
2.1.	Principe de l'impaction.....	85
2.2.	Protocole de prélèvement	86
	PARTIE B : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PM _{2,5-0,3} ET PM _{0,3}	88
1.	DOSAGE ÉLÉMENTAIRE PAR SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE (ICP-AES).....	88
2.	DOSAGE DES IONS HYDROSOLUBLES PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	90
3.	MICROANALYSE ÉLÉMENTAIRE CHNS-O.....	90
4.	ANALYSE PAR MEB-EDX.....	91
5.	ETUDE DES PHASES CRISTALLINES PAR LA TECHNIQUE DE DIFFRACTION DES RAYONS X (DRX).....	92
6.	ANALYSE DE LA FRACTION ORGANIQUE	92
6.1.	Identification des HAPs et des paraffines par GC-MS.....	92
6.2.	Identification des HAPs chlorés	93
6.3.	Dosage des O et N- HAPs	94
	PARTIE C : EVALUATION DE LA TOXICITE DES PM _{2,5-0,3} ET PM _{0,3}	95
1.	PRÉPARATION DES DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS DESTINÉS À L'ÉTUDE DE TOXICITÉ.	95
2.	EVALUATION DES EFFETS TOXIQUES DES ÉCHANTILLONS PRÉPARÉS.	97
2.1.	Matériel biologique.....	97
2.2.	Exposition des cellules aux particules atmosphériques	97
2.3.	Tests de cytotoxicité	98
2.3.1.	Dosage de l'ATP intracellulaire	98
2.3.2.	Dosage de la G6PD extracellulaire.....	99
2.4.	Evaluation de l'expression génique par RT-PCR	100
2.5.	Dosage des protéines totales	101
2.6.	Evaluation de l'effet génotoxique des PM.....	102
2.7.	Evaluation de la réponse inflammatoire	103
2.8.	Détection des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	105
2.9.	Evaluation de l'activité du récepteur Nrf2.....	107
2.10.	Evaluation des lésions oxydatives à l'ADN, aux protéines et aux lipides	110

2.10.1 Dosage de la 8-OHdG.....	110
2.10.2. Dosage des protéines carbonylées	112
2.10.3. Dosage de la 8-isoprostane	113
2.11. Dosage protéique des marqueurs de l'autophagie par western blot	114
2.12. Immunocytochimie	116
2.13. Dosage des Caspases	117
3. ANALYSES STATISTIQUES	117
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	123
III. ARTICLE 1	125
In-vitro evaluation of organic extractable matter from ambient pm _{2,5} using human bronchial epithelial beas-2b cells: cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation.	125
III. ARTICLE 2	163
Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions.	163
III. ARTICLE 3	205
Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM _{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM _{0.3}) particles in human bronchial epithelial Beas-2b cells.....	205
CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE	259
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	273
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	279
ANNEXE 1 :	293

Liste des figures

Figure 1 : Panache massif de poussières sahariennes traversant l'Océan Atlantique.....	30
Figure 2 : Répartition en phase gazeuse ou particulaire des HAP dans l'air ambiant selon le nombre de cycles	36
Figure 3 : Composition chimique des particules PM_1 dans l'hémisphère Nord.....	40
Figure 4 : Différence de visibilité à différentes périodes : période non polluée vs période polluée, au niveau du « Great Smoky Mountain ».....	41
Figure 5 : Effets de l'exposition aux particules sur la santé.....	43
Figure 6 : Anatomie du système respiratoire humain.....	44
Figure 7 : Taille et dynamique des particules dans le système respiratoire humain.....	46
Figure 8 : Schéma simplifié de l'induction génique du CYP1A1 par le B[a]P	48
Figure 9 : Voie de l'activation métabolique des HAP.....	50
Figure 10 : Schématisation du stress oxydant	51
Figure 11 : Mécanisme de défense enzymatique contre le stress oxydant	53
Figure 12 : Voie de signalisation de la protéine Nrf2.	54
Figure 13 : Mécanisme d'induction des dommages à l'ADN et de génotoxicité	58
Figure 14 : Induction de la voie Nrf2 par l'AhR via son induction transcriptionnelle directe (a) ou (b) indirectement suite à la génération des espèces réactives de l'oxygène.....	59
Figure 15 : Voie de signalisation NRF2-HO-1 et effet sur l'inflammation	62
Figure 16 : Induction de l'apoptose par voie intrinsèque et extrinsèque.....	64
Figure 17 : Yoshinori Ohsumi, spécialiste en biologie cellulaire, a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2016, pour ses découvertes sur les mécanismes de l'autophagie.	65
Figure 18 : Régulation de l'initiation du processus de l'autophagie.	68
Figure 19 : Représentation schématique des domaines structurales et fonctionnels des protéines P62, KEAP-1 et NRF2.....	71
Figure 20 : Interaction entre les deux voies : Nrf2 et autophagie	72
Figure 21 : Problématique générale de recherche	78
Figure 22 : Mécanismes potentiels de toxicité des particules atmosphériques évalués au cours de ce travail	79
Figure 23 : Localisation géographique du Liban et du site de prélèvement à Beyrouth.	83
Figure 24 : Rose des vents à Beyrouth durant la période d'échantillonnage	84
Figure 25 : impacteur en cascade TISCH® 235.....	85
Figure 26 : Échantillons obtenus à la fin du prélèvement : $PM_{2.5-0.3}$ et $PM_{0.3}$	87
Figure 27 : Protocole d'extraction de la fraction organique des $PM_{2.5-0.3}$	95
Figure 28 : Réaction de la luciférase : principe de la méthode de mesure de l'activité de l'ATP.....	99
Figure 29 : Principe du dosage enzymatique de la G6PD	100
Figure 30 : Marqueurs de dommage à l'ADN/ génotoxicité étudiés	103

Figure 31 : Protocole de dosage immunologique des biomarqueurs liés à l'induction des dommages à l'ADN et à la génotoxicité	104
Figure 32 : Protocole de dosage immunologique des cytokines inflammatoires	106
Figure 33 : Principe du test trans-AM@ Nrf2 pour le dosage et quantification de la protéine Nrf2 active.....	109
Figure 34 : Principe de dosage de la 8-OHdG dans les lysats cellulaires	111
Figure 35 : Protocole de dosage des protéines carbonylées	113
Figure 36 : Schéma représentatif de la cassette de transfert des protéines du gel à la membrane.....	115
Figure 37 : Schéma récapitulatif des différents paramètres étudiés au cours de l'étude préliminaire et approfondie de ce travail de recherche.....	119
Figure 38 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.....	128
Figure 39 : Représentation schématique des différents résultats obtenus durant l'étude.	130
Figure 40 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.....	166
Figure 41 : Représentation schématique des différents résultats obtenus dans l'article II.	168
Figure 42 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.	207
Figure 43 : Représentation schématique des différents résultats obtenus durant l'étude	209
Figure 44 : Schéma de synthèse illustrant les mécanismes potentiellement induits par une exposition aux particules atmosphériques et à leurs constituants, et étudiés lors de ce travail de thèse.....	263

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des 16 HAP prioritaires listés par US EPA	35
Tableau 2 : Valeurs limites des polluants atmosphériques recommandées par l’OMS et fixées par l’union européenne.	42
Tableau 3 : Liste des différents complexes protéiques impliqués dans l’initiation de l’autophagie cellulaire. ...	67
Tableau 4 : Diamètres de coupure des différents étages de l’impacteur TISCH modèle 235; 68m ³ /h (masse volumique des particules 1g/cm ³).	86
Tableau 5 : Masse de particules fines (PM _{2,5-0,3}) et de particules quasi-ultrafines (PM _{0,3}) collectées à Beyrouth, durant la période d’échantillonnage (03-01-17 au 08-03-17).....	87
Tableau 6 : Références des Taqman Gene Expression Assay utilisés pour l’étude de l’expression des gènes impliqués dans l’activation métabolique des HAP et dans la voie Nrf2.....	101
Tableau 7 : Liste des différentes protéines analysées par western blot.	116
Tableau 8 : Expression des gènes impliqués dans la voie de l’AhR (AhR, AhRR, ARNT) et la voie de métabolisation des composés organiques (CYP1A1, CYP1B1, EPHX-1, GSTA4) suite à l’exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm ²), pendant 6 et 24 heures	264
Tableau 9 : Induction des espèces réactives de l’oxygène H ₂ O ₂ et O ₂ ⁻ et des lésions à l’ADN (8-OHdG), aux protéines (protéines carbonylées) et aux lipides (8-IsoP) suite à l’exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm ²), pendant 6 et 24 heures	265
Tableau 10 : Evaluation de l’expression des gènes impliqués dans la voie de défense Nrf2, suite à l’exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm ²), pendant 6 et 24 heures.	267
Tableau 11 : Evaluation de l’expression protéique de TNF-α et IL-6, suite à l’exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm ²), pendant 6 et 24 heures.....	268
Tableau 12 : Expression des protéines impliquées dans la voie de génotoxicité/ arrêt du cycle cellulaire, suite à l’exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm ²), pendant 24 et 48h.....	269
Tableau 13 : Evaluation de l’expression protéique des caspases 3/7, caspase 8 et 9 suite à l’exposition des BEAS-2B à 12 µg PM-eq/cm ² , pendant 24 et 48 heures.....	270
Tableau 14 : Evaluation de l’expression protéique des marqueurs de l’autophagie (ATG5, Beclin1, P62 et LC3B-II) suite à l’exposition des BEAS-2B à 12 µg PM-eq/cm ² , pendant 24 et 48 heures	271

Liste des abréviations

A:

AhR : Aryl hydrocarbon receptor
AhRR : Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor
ARNT : AhR nuclear translocator
ATG : AuTophagy related Genes
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AA : Acide ascorbique
AIF : Apoptosis inducing factor
APAF : Apoptosis protease activating factor
AMPK : AMP-activated protein kinase

B:

BEAS-2B : Cellules épithéliales bronchiques humaines
BaP : Benzo[a]pyrène
BPCO : Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA : Albumine de sérum bovin

C:

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CYP : Cytochrome P450
COV : Composés organiques volatils
CAT : Catalase
CHK1/CHK2 : CheckPoint Kinases 1 et 2
CSF : Facteur stimulant les colonies

D:

DMA V : Acide diméthylarsonique V
DHA : Acide docosahexaénoïque
DAE : Diamètre aérodynamique équivalent
DISC : Death inducing signaling complex
DLC1/2 : Dyenine light chain 1/2
DNPH : Dinitrophénylhydrazine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DCM : Dichlorométhane
DRX : Diffractions de rayons X

E:

ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ERX : Eléments de réponse aux xénobiotiques
ERD : Eléments de réponses aux dioxines
ERA : Eléments de réponse aux antioxydants
EHm : Epoxyde hydrolase microsomale
EPA : Acide eicosapentaénoïque

F:

FET : Facteurs d'équivalents toxiques
FluO : Fluorène

G:

GST : Glutathion-S-transférase
GSH : Glutathion
GPx : Glutathion peroxydase
GSSG : Disulfure de glutathion
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

H

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HMOX : Hème oxygénase
H2AX : H2A histone family member X

I:

INF : Interféron
IL- : Interleukine
IsoP : Isoprostane
IAP : Inhibitors of apoptosis proteins

K:

KEAP1: Kealch-like-ECH associated protein

L:

LA : Acide linoléique

LPS : Lipopolysaccharide
LC3-B : Microtubule-associated protein light chain 3

M:

MMA V: Acide monométhylarsonique V
MMA III : Acide monométhylarsonique III
MUC: Mucine
MDA : Malondialdehyde
MiRNA : MicroRNA
MEB-EDX : Microscopie Electronique à Balayage
MDM2 : Murine double minute 2
MTORC : Mammalian target of rapamycin

N:

NASA : Administration nationale de l'aéronautique et de l'espace
NEM_{2.5-0.3} : Fraction non-extractible des particules fines
NO_x : Oxydes d'azote
NLS : Signal de localisation nucléaire
NES : Signal d'exportation nucléaire
NSCLC : Non-small-cell lung carcinoma
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
N-HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques nitrés
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NPyr : Nitropyrène

O:

OMS : Organisation mondiale de la santé
EOM_{2.5-0.3} : Fraction organique extractible des particules fines
EOM_{0.3} : Fraction organique extractible des particules quasi-ultrafines
O-HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques oxygénés

P:

PM : Particulate matter
PM_{2.5-0.3} : Particules fines
PM_{0.3} : Particules quasi-ultrafines
PCB : Polychlorobiphényles
PCDD : Polychlorodibenzo-p-dioxines
PCDF : Polychlorodibenzo-furanes
P21 : Protéine 21
P53 : Protéine 53

PCD : Programed cell death
PG : Prostaglandine
PBS : phosphate buffer solution
P62 : Protéine 62
PAS : Phagophore assembly site
PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

R:

RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RE : Réticulum endoplasmique

S:

SOD : Superoxyde dismutase
Smac/Diablo : Second mitochondrial activator of caspases/ Direct IAP binding protein of low PI

T:

TCDD : Tétrachloro-2, 3, 7, 8 dibenzo-para-dioxine
TLR-2 : Toll-like receptor 2
TNF : Facteur de nécrose tumoral
TPP : Triphénylphosphine
TMB : Tetraméthylbenzidine

U:

US-EPA : United States Environmental Protection Agency
ULK : Unc-51-like kinase

V:

VTR : Valeur toxicologique de référence

W:

WHO : World Health Organization

X:

XAP2 : HBV X-associated protein 2

Introduction

C'est à partir du XX^{ème} siècle, et principalement avec la révolution industrielle, qu'une pollution importante et chronique a commencé à affecter la qualité de l'air des villes des pays industrialisés, notamment en Europe et aux Etats-Unis, puis plus récemment celle des pays en voie de développement. Cette pollution atmosphérique, qu'elle soit d'origine anthropique ou naturelle, constitue un des facteurs de risque majeurs pour la santé de l'Homme. En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2018) a estimé que, chaque année, 7 millions de décès prématurés sont liés à la pollution de l'air. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé en 2013 la pollution de l'air extérieur parmi les "cancérogènes certains" pour l'Homme (groupe 1). Une grande partie de la toxicité de la pollution de l'air est due à la présence de particules fines ayant un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm (PM_{2.5}) qui ont, elles aussi, été classées comme "cancérogènes certains" pour l'Homme par le CIRC. Parmi les polluants atmosphériques, les PM_{2.5} peuvent être à l'origine de pathologies parmi les plus graves sur la santé, telles que le cancer du poumon et les accidents cardio-vasculaires (Kim et al., 2015).

Les particules atmosphériques représentent un mélange complexe associant des fractions inorganique (e.g., métaux, métalloïdes, sels), organique (e.g., composés organiques volatils, hydrocarbures aromatiques polycycliques), et biologique (pollens, bactéries et spores fongiques). Pour cette raison, à l'échelle cellulaire, le mécanisme d'action des particules, demeure une question ouverte de même que l'identification de la fraction responsable de certains effets observés.

Le Liban, pays du Moyen-Orient en cours de développement, situé à l'est du bassin méditerranéen, est confronté à de multiples problèmes liés à la qualité de l'air ambiant. Beyrouth, capitale du Liban, constitue le lien entre le nord et le sud du pays. Cette ville est le point central de l'économie Libanaise, et recense le seul aéroport, le principal port, et les principales industries et usines du pays. Le grand Beyrouth représente le lieu de travail de la plupart des libanais, même pour les villageois qui quittent leur village et migrent vers la capitale où la chance de trouver un travail est beaucoup plus importante. En 2013, des études ont montré que 75% de sa surface est bâtie, ce qui laisse peu de place aux espaces verts.

L'absence de transport en commun encourage l'utilisation des voitures personnelles, souvent âgées et équipées de moteurs polluants. Dans le pays, l'électricité est principalement

produite dans des centrales thermiques, mais les coupures d'électricité sont fréquentes. Pour remédier à cela, des générateurs privés fonctionnant au diesel sont utilisés pour alimenter les logements, les usines et les industries, ce qui représente une source importante de pollution.

A ces deux facteurs s'ajoute le problème du traitement des déchets solides, qui touche l'agglomération de Beyrouth et l'ensemble du pays. Cette crise a atteint son maximum entre 2015 et 2016 et a été responsable d'une augmentation de la concentration des polluants dans l'air de façon inquiétante (Baalbaki et al., 2016). En outre, vu son emplacement à l'est de la Mer Méditerranée, le Liban est exposé ponctuellement à des poussières provenant du désert du Sahara en Afrique du Nord et du désert d'Arabie. Ces principaux facteurs, ajoutés à l'absence de l'application de certaines lois en lien avec la protection de l'environnement sont responsables d'une pollution atmosphérique très importante.

Les concentrations quotidiennes des $PM_{2.5}$ ont été associées à un nombre croissant d'hospitalisations aux urgences par maladies cardiovasculaires et respiratoires à Beyrouth (Nakhlé et al., 2015). Les niveaux élevés de pollution atmosphérique par les particules fines au Liban sont localisés dans les grandes villes comme Beyrouth et Tripoli, dans les zones côtières situées près des usines à Zouk (centrale thermique), Jiyeh (centrale thermique), Chekka (carrières, cimenterie et production de fertilisants) et Sibline (carrières et cimenterie). En 2017, 0,4% des décès au Liban ont pu être attribués à la pollution atmosphérique ("Global Burden of Disease (GBD)," 2014) (<https://vizhub.healthdata.org/sdg/>).

Au cours de ce travail de thèse, des particules fines ont été collectées sur un site urbain fortement influencé par le trafic routier. Ce site appartient à la région du Mont-Liban à Baabda, dans les banlieues sud de Beyrouth, capitale du Liban comptant environ 2 millions d'habitants (environ 30% de la population totale du Liban). Il est localisé au cœur d'un quartier résidentiel traversé par un axe routier principal qui relie le centre de Beyrouth à l'aéroport international.

Des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) ont été échantillonnées et caractérisées afin de déterminer leur composition chimique, puis considérées pour une étude toxicologique. Plus précisément, il s'agissait de comparer les effets toxiques des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) avec ceux de leur fraction organique extractible ($EOM_{2.5-0.3}$) et de leur fraction non extractible ($NEM_{2.5-0.3}$) d'une part, et d'autre part de comparer les effets de l'extrait organique de la fraction fine ($EOM_{2.5-0.3}$) avec celui de la fraction quasi-ultrafine ($EOM_{0.3}$).

L'étude toxicologique s'est appuyée sur l'utilisation de cellules épithéliales bronchiques humaines (lignée BEAS-2B) cultivées *in vitro*, afin d'évaluer la cytotoxicité globale des différentes fractions, ainsi que leurs rôles dans l'induction des mécanismes cellulaires tels que l'activation métabolique des composés organiques, l'induction de la réponse inflammatoire et du stress oxydant, ainsi que la survenue de dommages oxydatifs aux macromolécules cellulaires, que ce soit au niveau de l'ADN, des protéines ou des lipides, mais également de la potentielle activation de mécanismes de génotoxicité. Nous avons enfin évalué la capacité de ces particules atmosphériques et/ou extraits à induire l'autophagie cellulaire et l'apoptose en réponse notamment aux dommages oxydatifs.

Le manuscrit de cette thèse se compose de 4 chapitres.

- Le premier chapitre sera consacré à une synthèse bibliographique, sur les particules atmosphériques, leurs caractéristiques physico-chimiques, ainsi que leurs impacts sur l'environnement et sur la santé humaine. Ce chapitre décrit aussi les principaux mécanismes d'action évalués dans ce travail, que ce soit l'activation métabolique, l'induction du stress oxydant et des lésions oxydatives, ainsi que le mécanisme de l'autophagie cellulaire et de l'apoptose.
- Le deuxième chapitre décrit la méthodologie du travail, le site et la technique d'échantillonnage adoptée, la préparation des différentes fractions étudiées, ainsi que les méthodes de caractérisation physico-chimique des particules. De même, les protocoles utilisés pour l'étude de leur impact toxicologique *in-vitro*, sur les cellules BEAS-2B seront développés.
- Dans le chapitre 3, les résultats seront présentés et discutés sous formes de trois articles, le premier publié dans la revue Environmental Research, le deuxième dans Chemosphere et le troisième actuellement soumis dans Environmental Pollution. Avant chaque article, une introduction présentant la problématique sera suivie d'une brève description des principaux résultats. Une conclusion prendra place à la fin de chaque article.
- Le chapitre 4 sera quant à lui consacré à la discussion générale des résultats obtenus.

Enfin, nous concluons et des perspectives à ce travail seront proposées.

Chapitre I : Etat de l'art



Pollution atmosphérique- Beyrouth, Liban

(François el BACHA)

Chapitre I : Etat de l'art

Partie A : La pollution atmosphérique particulaire

1. Définition de la pollution atmosphérique

Par pollution de l'air, on entend la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère (OMS). Les appareils utilisés pour la combustion au sein des foyers, les véhicules automobiles, les industries et les feux de forêt sont des sources fréquentes de pollution atmosphérique. Les polluants les plus nocifs pour la santé publique sont notamment les matières particulaires, le monoxyde de carbone, l'ozone, le dioxyde d'azote et le dioxyde de soufre. La pollution de l'air, extérieur comme intérieur, entraîne entre autres des maladies respiratoires qui peuvent être mortelles.

2. Les principales sources de polluants atmosphériques

Les polluants atmosphériques peuvent être générés par des processus naturels ou anthropiques. Toute source n'étant pas influencée par l'activité humaine est considérée comme étant une source naturelle. Parmi ces dernières, il est possible de citer les éruptions volcaniques, l'érosion des sols, les sels marins, ou encore les pollens.

Les sources anthropiques sont généralement représentées par les activités industrielles, agricoles, les émissions du trafic routier, la production de l'énergie thermique, ainsi que l'incinération des déchets et plus généralement les activités domestiques.

3. Classification des polluants

Les substances présentes dans l'atmosphère sont multiples. En premier lieu, on peut différencier deux catégories de polluants selon leur mécanisme de formation : les polluants primaires qui sont directement émis dans l'atmosphère par une source naturelle ou anthropogénique, alors que les polluants secondaires, proviennent de la transformation dans l'atmosphère de certains polluants primaires.

Cette distinction primaires/secondaires est valable également pour les particules. La formation de particules secondaires est un processus qui implique souvent des composés gazeux qui se condensent ou réagissent dans l'atmosphère et vont donner lieu à la formation

de particules (conversion gaz-particules). Ceci s'explique en général par des réactions conduisant à la formation d'espèces oxydées, moins volatiles que leur précurseur, et qui entraîne la formation de particules par des processus physiques de nucléation et de condensation (Tomaz, 2015).

Qu'elles soient d'origine naturelle ou anthropogénique, ces particules peuvent être transportées dans l'atmosphère sur des distances pouvant dépasser des centaines de kilomètres. A titre d'exemple, des études ont montré que les fumées résultantes des feux de forêts en Indonésie et au Québec, ont contaminé l'air d'endroits éloignés d'une centaine de kilomètres (Sapkota et al., 2005). Par ailleurs, les particules peuvent aussi traverser les océans et se déposer au niveau d'autres continents. A titre d'exemple, le 18 juin 2018, les satellites de la NASA ont commencé à détecter d'épais panaches de poussière saharienne au-dessus de la Mauritanie, du Sénégal, de la Gambie et de la Guinée-Bissau avant de traverser l'océan Atlantique (Figure 1). Pendant les dix jours suivants, le ciel au-dessus de l'Afrique de l'Ouest et de l'Atlantique tropical a été teinté d'une nuance jaune caractéristique (Visible earth, NASA, 2018).

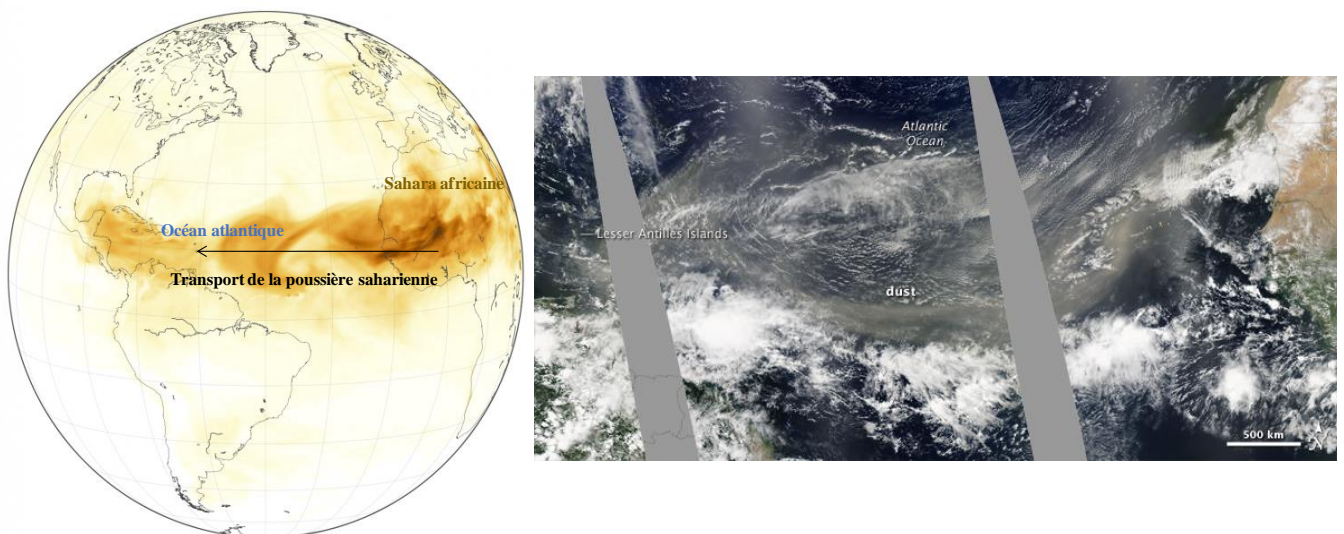


Figure 1 : Panache massif de poussières sahariennes traversant l'Océan Atlantique, image capturée par le satellite GOES, NASA, le 27 juin 2018 (<https://earthsky.org/earth/sahara-dust-travels-africa-texas>).

4. Les principaux polluants atmosphériques

Parmi les polluants atmosphériques les plus répandus, on distingue le monoxyde de carbone (CO), les oxydes d'azote (NO_x), le dioxyde de soufre (SO₂), l'ozone (O₃), les

composés organiques volatils (COV), ainsi que les particules atmosphériques de composition complexe (éléments majeurs et traces incluant des espèces métalliques, espèces ioniques, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorobiphényles (PCB), polychlorodibenzo-p-dioxines et polychlorodibenzofurannes (PCDD/PCDF)...).

4.1. Les polluants inorganiques

4.1.1. Les NO_x

Les oxydes d'azote sont considérés en général comme des marqueurs de la pollution atmosphérique liée au trafic routier, maritime et aérien (Hamra et al., 2015). Les NO_x sont principalement émis dans l'atmosphère sous forme de NO, qui à son tour réagit directement avec l'oxygène de l'air, l'ozone des couches inférieures, ou encore les espèces radicalaires présentes dans l'atmosphère pour former du dioxyde d'azote (NO₂). NO₂ agit comme un oxydant puissant provoquant une toxicité pulmonaire, induite par la peroxydation lipidique des membranes, l'augmentation de la perméabilité cellulaire, allant jusqu'à la mort cellulaire. De plus, NO₂ possède la capacité de réduire l'activité anti-bactérienne des macrophages alvéolaires, augmentant par la suite le risque d'infections bactériennes et même virales des voies aériennes (Wolfe and Patz, 2002).

4.1.2. Le SO₂

Le dioxyde de soufre est émis dans l'atmosphère par des processus naturels (émissions volcaniques, décomposition de matière organique) et par des processus anthropogéniques (Afif et al., 2008), tels que la combustion de combustibles fossiles riches en soufre (charbons, fuels lourds utilisés dans les navires). Il peut séjourner entre 1 à 7 jours dans l'atmosphère, période durant laquelle le SO₂ se convertit en sulfate ou en acide sulfurique, en présence d'humidité, sous l'action de la lumière, des oxydants photochimiques, ou bien sous l'effet catalytique de certaines particules présentes dans l'air. De plus, les métaux au sein des particules, tels que le vanadium (V), manganèse (Mn) et le fer (Fe) peuvent agir comme catalyseur pour la conversion de SO₂ en sulfate et acide sulfurique. Les expositions à court terme au SO₂ peuvent nuire au système respiratoire humain et rendre la respiration difficile. Les asthmatiques, en particulier les enfants, sont sensibles à ces effets du SO₂ (US EPA, 2016a).

4.1.3. L'Ozone

L'ozone (O₃) est un des composés atmosphériques les plus étudiés, étant considéré comme un polluant dans la troposphère, couche basse de l'atmosphère, mais aussi présentant

des effets bénéfiques dans les couches plus hautes (stratosphère) en tant que filtre du rayonnement solaire ultraviolet. L'ozone fait partie des polluants secondaires, formés dans l'atmosphère par des réactions photochimiques entre l'oxygène et les polluants primaires tels que les COV, les NOx (Mazzuca et al., 2016). Respirer de l'ozone troposphérique peut avoir de nombreux effets sur la santé, observés dans de larges couches de la population. L'exposition à court terme à l'ozone est également associée à une mortalité quotidienne accrue. Certains de ces effets incluent l'induction de symptômes respiratoires (toux, irritation de la gorge, douleur, sensation de brûlure et inconfort à la poitrine lors d'une respiration profonde, oppression thoracique et respiration sifflante ou essoufflement) allant jusqu'au déclin de la fonction pulmonaire et inflammation des voies respiratoires (US EPA, 2016b).

4.1.4. Les éléments majeurs et traces :

Les éléments sont présents dans la nature en différentes teneurs. Certains d'entre eux comme le calcium (Ca), l'aluminium (Al), le fer (Fe), sont des éléments majeurs de la croûte terrestre. D'autres éléments sont plutôt présents à l'état de traces, et certains d'entre eux sont toxiques même à très faibles doses. C'est notamment le cas des éléments arsenic (As), plomb (Pb), cadmium (Cd), nickel (Ni), mercure (Hg) et zinc (Zn).

Ces éléments peuvent cibler le corps humain après leur absorption par inhalation, ingestion et/ou par passage percutané. Ces éléments peuvent être intrinsèquement toxiques ou le devenir après leur métabolisation, comme dans le cas de l'arsenic inorganique, qui suite à sa méthylation produit l'acide monométhylarsonique (MMAV) et de l'acide diméthylarsonique (DMA V) éliminés de l'organisme par l'urine, mais aussi un intermédiaire (MMA III) toxique et bioaccumulable.

Certains éléments et métaux sont indispensables au bon fonctionnement cellulaire et de l'organisme, cependant une augmentation de leur concentration peut les rendre toxiques pour l'organisme. A titre d'exemple, les niveaux de calcium dans le corps sont contrôlés par la vitamine D et les hormones parathyroïdiennes. L'absence de régulation de la teneur en Ca^{2+} entraîne la calcification des tissus.

Au niveau cellulaire l'exposition aux éléments et aux métaux lourds a montré leur capacité d'induire des dommages cellulaires via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). De plus, le chrome, le cadmium et le nickel sont des métaux connus pour leur génotoxicité, via l'altération des mécanismes de réparation de l'ADN. L'exposition au

plomb, classé cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B) est associée à des tumeurs rénales, cérébrales, et pulmonaires (Fortoul et al., 2015).

4.2. Les polluants organiques

4.2.1. Les composés organiques volatils

Les composés organiques volatils sont des composants "clé" de la chimie atmosphérique, jouant un rôle majeur dans le cycle de l'ozone troposphérique et dans la formation des aérosols secondaires. Les COV biogéniques sont émis par la végétation, les sols et les océans. Les COV anthropiques proviennent essentiellement des émissions du trafic, des industries chimiques, des secteurs résidentiel et tertiaire ainsi que des processus de combustion (bois, charbon).

Parmi les COV, le benzène et le formaldéhyde sont classés cancérigènes certains pour l'homme par le CIRC. L'exposition à court terme aux COV a montré un pouvoir irritant (irritation des yeux et du système respiratoire), alors que l'exposition à des faibles concentrations à long terme a montré divers effets, selon le COV impliqué. Ainsi, l'exposition chronique au toluène entraîne des troubles neurologiques (Eller et al., 1999; Filley et al., 2004). Une exposition prolongée au xylène peut provoquer des maux de tête, une fatigue extrême, des tremblements, une altération de la concentration et de la mémoire à court terme (Kandyala et al., 2010). L'exposition chronique au chloroforme par inhalation chez l'homme est associée à des effets sur le foie et le système nerveux central, notamment l'hépatite, la jaunisse, la dépression et l'irritabilité (ATSDR - Toxicological Profile, 1997).

4.2.2. Les polychlorobiphényles (PCB), Dioxines (PCDD) et Furanes (PCDF)

Les PCBs sont des composés organiques synthétiques, qui forment une famille de 209 congénères, qui diffèrent par le nombre de substitution par l'élément chlore et par leur emplacement au niveau de la molécule (INERIS, 2012; US EPA, 2015). Ces 209 congénères sont répartis en deux catégories définies en prenant compte leurs effets tératogènes: les PCBs dioxines like (PCB-dioxin-like) et les PCBs (PCB-non dioxin-like). En 1982, 7 PCBs, ont été sélectionnés par le Bureau Communautaire de référence de la commission européenne (Bruxelles), comme étant les composés à rechercher prioritairement du fait de leur persistance et leur abondance dans l'environnement. L'OMS recommande de ne pas être exposé à une concentration journalière moyenne supérieure à 3 ng/m³ de PCBs (INERIS, 2012). Ces composés étaient utilisés dans les transformateurs électriques, souvent appelés pyralène

(Daouk, 2012; Ludewig et al., 2008). On les trouve aussi dans les huiles, dans les peintures et les isolants électriques. La libération de PCBs dans l'atmosphère peut provenir de déchets mal conditionnés contenant des PCBs, ainsi que de l'incinération sauvage de déchets municipaux et industriels en plein air, mais aussi de la fuite ou du rejet provenant des transformateurs électriques. La dégradation de ces composés dans l'environnement est faible, ce sont des composés stables avec une période de demi-vie longue. Ces composés possèdent un caractère lipophile et sont donc capables de s'accumuler dans les tissus riches en matière grasse, mais aussi dans les sites de détoxification comme le foie (Fisk et al., 2001; Letcher et al., 2010; Nfon and Cousins, 2006). Des niveaux élevés de PCB28 et PCB52 ont été détectés en proportion significativement plus importante dans le lait maternel des femmes fumeuses et/ou qui travaillent dans des zones industrielles par rapport à celles qui travaillent dans des zones non-industrialisées (Angulo et al., 1999). Beaucoup d'études ont montré que les PCBs causent des effets nocifs sur la santé, y compris sur le système immunitaire, reproductif, nerveux et endocrinien, mais aussi un effet cancérigène, qui dépend, en plus de la concentration, de la nature des PCBs dans le mélange.

Les polychlorodibenzo-p-dioxines polychlorés (PCDDs) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) sont des composés hétérocycliques oxygénés. Ils résultent de la combustion incomplète des hydrocarbures en présence du chlore, possèdent des points de fusion très élevés, et sont stables aux acides et aux bases, ce qui les rends très persistants dans l'environnement.

4.2.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

a. Structure des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés organiques formés principalement des éléments carbone et hydrogène, dont la structure comprend au moins deux cycles benzéniques. Ce sont des composés persistants dans l'environnement, ayant des pouvoirs toxiques différents. Parmi ces composés, 16 HAP ont été classés prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA), et leur concentration atmosphérique est à surveiller. Des facteurs d'équivalents toxiques (FET) ont été définis, depuis 1977, afin d'établir une valeur toxicologique de référence (VTR) pour les effets cancérigènes induits par un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action. Ceux-ci sont calculés en prenant le BaP comme référence pour lequel le FET est par convention égal à 1 (INERIS, 2003) (Tableau 1).

Tableau 1: Liste des 16 HAP prioritaires listés par US EPA (FET : Facteur d'Equivalent Toxique)

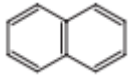
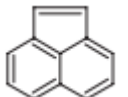
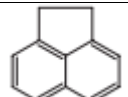
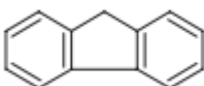
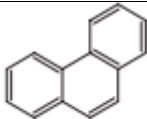
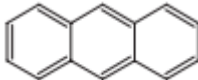
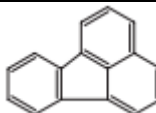
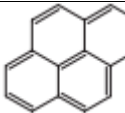
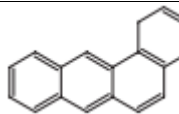
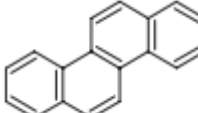
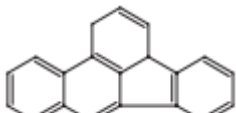
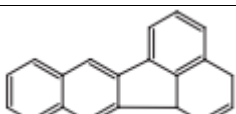
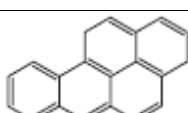
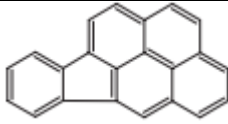
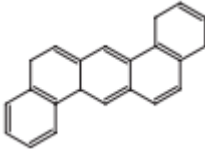
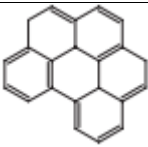
Composé	Formule brute	Structure	FET (éq BaP)	Poids moléculaire (g/mol)
Naphtalène	$C_{10}H_8$		0,001	128
Acénaphtylène	$C_{12}H_8$		0,001	152
Acénaphtène	$C_{12}H_{10}$		0,001	154
Fluorène	$C_{13}H_{10}$		0,001	166
Phénanthrène	$C_{14}H_{10}$		0,001	178
Anthracène	$C_{14}H_{10}$		0,01	178
Fluoranthène	$C_{16}H_{10}$		0,001	202
Pyrène	$C_{16}H_{10}$		0,001	202
Benz[a]anthracène	$C_{18}H_{12}$		0,1	228
Chrysène	$C_{18}H_{12}$		0,01	228
Benzo[b]fluoranthène	$C_{20}H_{12}$		0,1	252
Benzo[k]fluoranthène	$C_{20}H_{12}$		0,1	252
Benzo[a]pyrène	$C_{20}H_{12}$		1	252

Tableau 1 (suite): Liste des 16 HAP prioritaires listés par US EPA (FET : Facteur d'Equivalent Toxique)

Composé	Formule brute	Structure	FET (éq BaP)	Poids moléculaire (g/mol)
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	C ₂₂ H ₁₂		0,1	276
Dibenz[a, h]anthracène	C ₂₂ H ₁₄		1 : Forte concentration 5 : Faible concentration	278
Benzo[g,h,i]pérylène	C ₂₂ H ₁₂		0,01	276

Les HAP sont caractérisés par une pression de vapeur saturante comprise entre 10 et 10^{-10} pascals et une répartition entre les phases gazeuses et particulaires. De façon générale, les HAP avec 2 à 4 cycles sont les moins lourds, possèdent une pression de vapeur saturante relativement élevée et sont principalement présents en phase gazeuse. A l'inverse, les HAP qui possèdent 5 cycles benzéniques et plus se retrouvent principalement en phase particulaire (**Figure 2**).

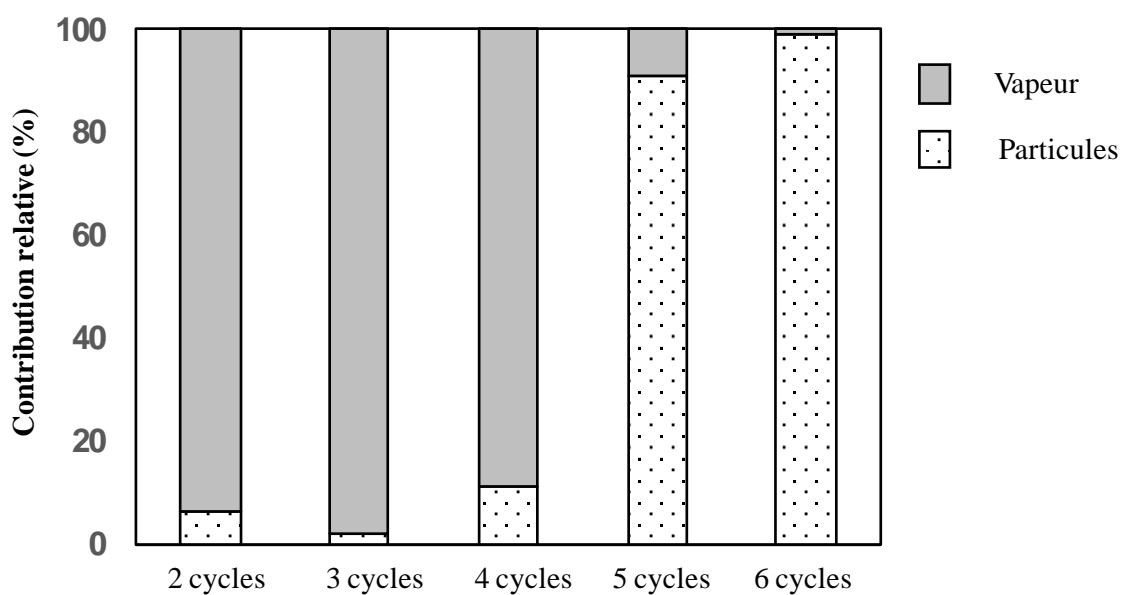


Figure 2 : Répartition en phase gazeuse ou particulaire des HAP dans l'air ambiant selon le nombre de cycles (adapté de (Zhou et al., 2013)).

b. Origine des HAP

Les HAP sont majoritairement produits durant la combustion incomplète et la pyrolyse des substances organiques. Ils peuvent être également émis naturellement ; les émissions naturelles représentent environ 10% du total des émissions et comprennent principalement les émissions résultant des feux des forêts et des éruptions volcaniques (Ravindra et al., 2008). Les sources anthropogéniques génèrent 90% du total des émissions et comprennent les émissions domestiques, les émissions du trafic, les émissions industrielles et les sources agricoles. Les émissions du trafic englobent les émissions liées aux transports routier, ferroviaire, maritime et aérien. Les HAP émis par ces sources dépendent du type de moteur, et de la nature et la qualité du carburant utilisé (les véhicules alimentés au diesel ont des émissions de HAP plus élevées que les véhicules alimentés à l'essence) (Ravindra et al., 2008). Les sources industrielles les plus importantes de HAP sont les industries métallurgiques et sidérurgiques, les raffineries pétrolières, les incinérateurs de déchets ainsi que les industries du bitume et de l'asphalte et de production d'engrais (Cecinato et al., 2014).

c. Formation des dérivés de HAP : les N-HAP et les O-HAP

En plus des sources d'émission directe, des dérivés nitrés (N-HAP) et oxygénés (O-HAP) de HAP peuvent être générés secondairement dans l'atmosphère par réaction en phase gazeuse entre les HAP et les oxydants atmosphériques (O_3 , OH° , SO_2 et NO_x) ou en phase hétérogène, suite à l'oxydation des HAP liés aux particules par les oxydants atmosphériques. En plus, les O-HAP peuvent être formés suite à la dégradation des n-HAP sous l'action de la lumière et des oxydants atmosphériques (Albinet, 2006).

d. Concentrations et impact sanitaire des HAP et de leurs dérivés

Durant les dernières décennies, les HAP et leurs dérivés dans l'atmosphère ont été largement étudiés. La concentration des HAP varie de l'ordre de quelques pg/m^3 à quelques dizaines ou centaines de ng/m^3 . Celle des O-HAP peut varier de $10 pg/m^3$ à $10 ng/m^3$ (Albinet et al., 2007; Allen et al., 1997; del Rosario Sienna, 2006; Keyte et al., 2013; Liu et al., 2006; Ringuet et al., 2012; Walgraeve et al., 2010; Wang et al., 2011; Wilson et al., 1995; Yassaa et al., 2001), alors que les N-HAP sont présents à des concentrations 10 fois plus faibles, allant de $0,1 pg/m^3$ à $1 ng/m^3$ (Albinet et al., 2008, 2007; Bamford and Baker, 2003; Dimashki, 2000; Gupta et al., 1996; Huang et al., 2014; Marino et al., 2000; Ringuet et al., 2012; Wang et al., 2011). Globalement, les concentrations de ces composés varient suivant la proximité

des sources d'émission et selon la saison. Parmi les N-HAP, le 1-Nitropyrene est notamment proposé comme marqueur des émissions de véhicules diesel (Murakami et al., 2008), alors que le 9,10-Nitrofluoranthène, composé formé uniquement dans l'atmosphère, représente un bon marqueur de formation des composés secondaires. En considérant le rapport de ces deux composés, 9,10-Nitrofluoranthène/1-Nitropyrene, l'origine prédominante des dérivés nitrés peut être établie. Un rapport supérieur à 5 indique une prédominance des sources secondaires, alors qu'un rapport inférieur à 5 révélera l'influence de sources d'émissions primaires (Tomaz, 2015).

e. Impact sanitaire des HAP, N et O-HAP

Les effets des HAP et de leurs dérivés sur la santé diffèrent selon le composé, la durée d'exposition, ainsi que la voie d'exposition, mais aussi en fonction des susceptibilités interindividuelles, tels que le sexe, l'âge et l'état physiologique et de santé (Kim et al., 2013). Les HAP représentent des composés pro-génotoxiques. Ils deviennent toxiques après activation métabolique. Les métabolites obtenus après cette activation vont, selon leur nature, interagir avec des macromolécules cellulaires et induire un dysfonctionnement de l'organisme. Le benzo(a)pyrene représente le HAP avec l'impact cancérigène le plus important et le plus documenté ; il est considéré comme la molécule de référence afin de déterminer la cancérogénicité des HAP. L'OMS n'a pas défini de recommandations sur les concentrations atmosphériques de BaP, mais elle a estimé un niveau de référence en considérant un risque acceptable de 1/100 000 (1 cas supplémentaire sur 100 000 personnes) de développer un cancer du poumon lors de l'exposition à un mélange de HAP. Considérant cela, le niveau de référence est fixé à 0.12 ng/m^3 (ETC/ACM, 2011). A titre de comparaison, l'Europe fixe une valeur limite de concentration dans l'atmosphère de 1 ng/m^3 en moyenne annuelle (Directive 2008/50/EC, 2008). Notons que le dibenz[a,h]anthracène est également un HAP à fort pouvoir cancérigène lorsqu'il est considéré à faible dose avec un FET égal à 5.

Les dérivés fonctionnalisés sont connus pour présenter des propriétés cancérigènes, mutagènes et oestrogéniques beaucoup plus importantes que les HAP parents (Pedersen et al., 2005). Les N-HAP auraient un effet mutagène plus important que les HAP (2.10^5 fois supérieur (Pedersen et al. 2005, 2004), et plus cancérigène (10 fois plus élevé). Pour autant, jusqu'à ce jour, aucun N-HAP n'a été classé cancérigène certain pour l'Homme. Certains ont été classés cancérigène probable (2A) tel que le 1-Nitropyrene et possible (2B) tel que le 2-Nitrofluorène (IARC, 2014). En ce qui concerne les O-HAP, les cétones semblent être les

plus mutagènes. La 9.10-anthraquinone est quant à elle classée possiblement cancérigène (2B) (IARC, 2012).

4.3. La matière particulaire

4.3.1. Définition et classification

Les particules atmosphériques ou matières particulaires (Particulate Matter, PM) ou encore appelées aérosols, correspondent à des particules solides et/ou liquides en suspension dans l'air. Selon leur diamètre aérodynamique, les particules atmosphériques sont classées en trois catégories :

- Les particules grossières ou $PM_{2.5-10}$ ayant un diamètre aérodynamique équivalent compris entre 2,5 et 10 μm , et proviennent généralement de la remise en suspension de poussières de sol, des embruns marins, des bioaérosols tels que les pollens et les spores, et du cisailage mécanique de particules plus grosses.
- Les particules fines ($PM_{2.5}$) ayant un diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 μm , proviennent essentiellement des activités anthropiques et des émissions issues des procédés de combustion,
- Les particules ultrafines $PM_{0.1}$ ayant un diamètre inférieur ou égal à 0,1 μm .

4.3.2. Composition chimique des PM

Les particules atmosphériques sont un mélange hétérogène et complexe d'espèces chimiques organiques et inorganiques, auxquelles s'additionne une fraction biologique. La fraction inorganique est principalement représentée par des espèces hydrosolubles telles les ions sulfate, nitrate, ammonium, chlorure, sodium, les métaux, les métalloïdes et le carbone inorganique, alors que les HAP et COV sont les plus abondants au sein de la fraction organique. La fraction biologique est généralement caractérisée par les bactéries, les champignons, les fragments de végétaux et les pollens (Matthias-Maser and Jaenicke, 2000). Cette composition chimique varie d'un site à un autre et dépend aussi des facteurs météorologiques et climatiques (direction, température, vitesse de vent, saison...) ainsi que des différentes sources d'émission à proximité du site d'études. A titre d'exemple, la **Figure 3** montre la variation en composition des PM_1 dans l'hémisphère nord, en composés organiques, sulfate, ammonium, nitrate et en chlorure.

Cette variabilité en termes de composition contribue aux fluctuations des effets sur la santé, d'où l'importance d'une caractérisation physico-chimique des particules en parallèle d'une étude toxicologique.

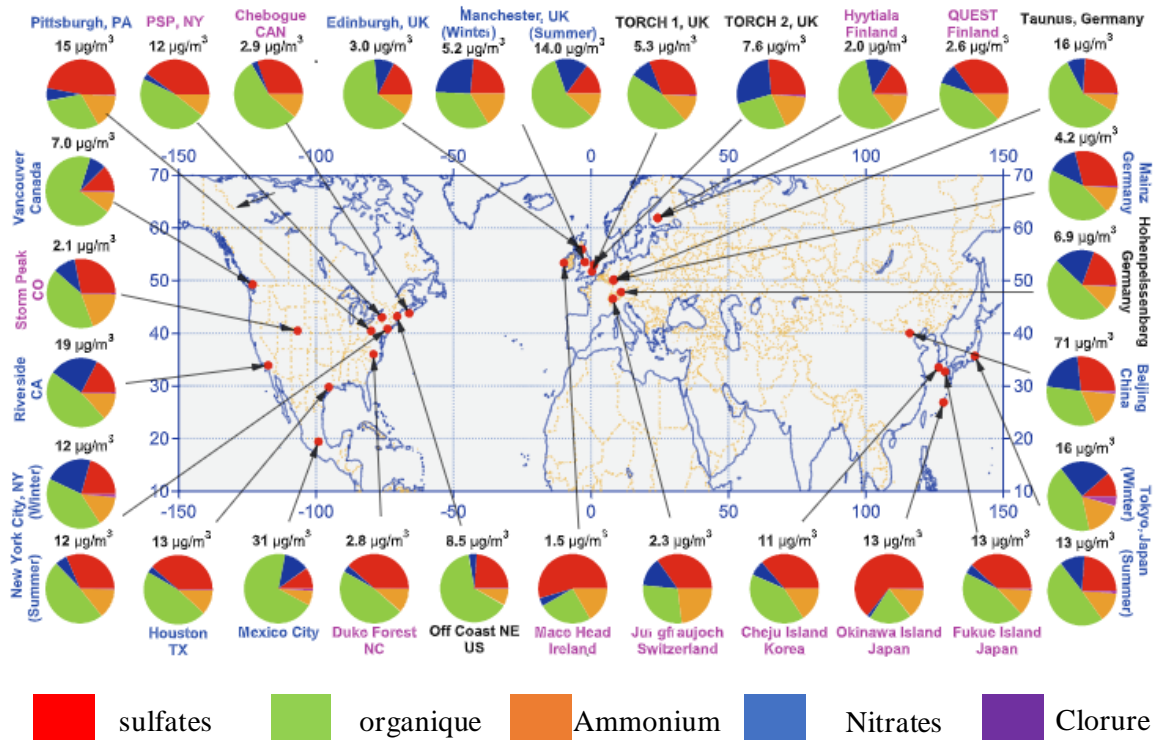


Figure 3 : Composition chimique des particules PM_1 dans l'hémisphère nord (Zhang et al., 2007).

4.3.3. Impact des particules atmosphériques sur l'environnement

a. Impact sur la visibilité

Les particules fines ($PM_{2.5}$) sont la principale cause de la perte de visibilité (ou la brume). La brume se produit lorsque le soleil rencontre de minuscules particules de pollution dans l'air, ce qui réduit la netteté et la couleur de ce que nous voyons (Figure 4).

b. Impact sur le climat

Les émissions de polluants dans l'air peuvent entraîner des changements climatiques. L'ozone dans l'atmosphère réchauffe le climat, tandis que différents composants des particules peuvent avoir des effets de réchauffement ou de refroidissement sur le climat. Par exemple, le carbone noir, un polluant particulaire issu de la combustion, contribue au réchauffement de la Terre, tandis que les sulfates de particules refroidissent l'atmosphère terrestre (US EPA, 2018).



Figure 4 : Différence de visibilité à différentes périodes : période non polluée vs période polluée, au niveau du « Great Smoky Mountain ». (adapté de (US EPA, 2015))

4.3.5. Impact sur la santé

Les particules fines sont considérées de nos jours comme l'un des principaux facteurs de risques environnementaux (Longhin et al., 2016) et sont responsables, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2016) de 4.2 millions de morts prématurées par an dans le monde. L'exposition aux particules cause notamment des maladies pulmonaires telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive pulmonaire (BPCO), et peut engendrer le développement du cancer pulmonaire (Kim et al., 2015; Loomis et al., 2013), ainsi que des maladies cardiovasculaires. L'impact des PM sur la santé sera détaillé dans la Partie B de ce chapitre.

5. Réglementations et Recommandations

Le fait de respirer de l'air pur est considéré comme une condition essentielle à la santé et au bien-être de l'homme. Les lignes directrices de OMS, relatives à la qualité de l'air, visent à renseigner sur les concentrations des polluants recommandées, auxquels ou en dessous desquels les effets sont considérés comme acceptables, et à offrir des conseils sur la façon de réduire les effets sanitaires de la pollution de l'air. Elles ont pour principal objectif d'être des références pour l'élaboration des réglementations internationales.

Depuis 2010, l'Union Européenne fixe des plafonds d'émission de polluants atmosphériques dans chaque Etat membre. En décembre 2013, la Commission européenne a proposé une nouvelle directive concernant la réduction des émissions de polluants atmosphériques d'ici 2030 afin de tenir davantage compte des risques sanitaires et des effets sur l'environnement. Le tableau ci-dessous, montre les recommandations de l'OMS et les valeurs fixées par l'union européenne pour certains polluants présentés ci-dessus.

Tableau 2: Valeurs limites de concentration des polluants atmosphériques recommandées par l'OMS et fixées par l'union européenne.

Polluant	Ligne directrice OMS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Durée d'exposition	Valeurs limites UE ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Durée d'exposition
PM ₁₀	20	Année	40	Année
	50	Jour	50 (35 jours de dépassement autorisés)	Jour
PM _{2.5}	10	Année	25	Année
	25	Jour	Pas de valeur limite	Jour
NO ₂	40	Année	40	Année
	200	heure	200	Heure
O ₃	100	8 heures	-	-
SO ₂	20	Jour	125	Jour
		10 minutes	350	heure
CO	7000	Jour	10000	8 heures
	10000	8 heures		
	30000	Heure		
	100000	15 minutes		
Pb	0.5	Année	0.5	Année
BaP	0.12	Année	1	Année

Partie B : Impact des particules atmosphériques sur la santé humaine.

1. Etudes épidémiologiques sur l'impact des PM

En 2018, l'OMS a estimé que 91% de la population mondiale vivait dans des lieux où les niveaux de la qualité de l'air dépassent les limites qu'elle a fixées. De plus, la pollution atmosphérique serait responsable de 7 millions de décès prématurés chaque année (OMS, 2018), voire même 8 millions selon une récente étude (Lelieveld et al., 2019). Les particules atmosphériques sont connues pour être des contributeurs principaux de cette pollution.

L'exposition aux particules atmosphériques a été identifiée comme la cause de différents effets sur la santé, l'apparition de symptômes respiratoires, l'exacerbation de maladies respiratoires et cardio-vasculaires chroniques, de la diminution de la fonction pulmonaire et de l'augmentation de la mortalité prématurée (Guaita et al., 2011; Halonen et al., 2009; Perez et al., 2012). De même, l'exposition aux PM affecte le développement pulmonaire chez l'enfant, en induisant notamment des déficits réversibles de la fonction pulmonaire, une réduction progressive du taux de croissance pulmonaire et un déficit de la fonction pulmonaire à long terme (Brauer et al., 2012). L'impact de l'exposition aux particules sur la santé est brièvement décrit dans la **Figure 5**.

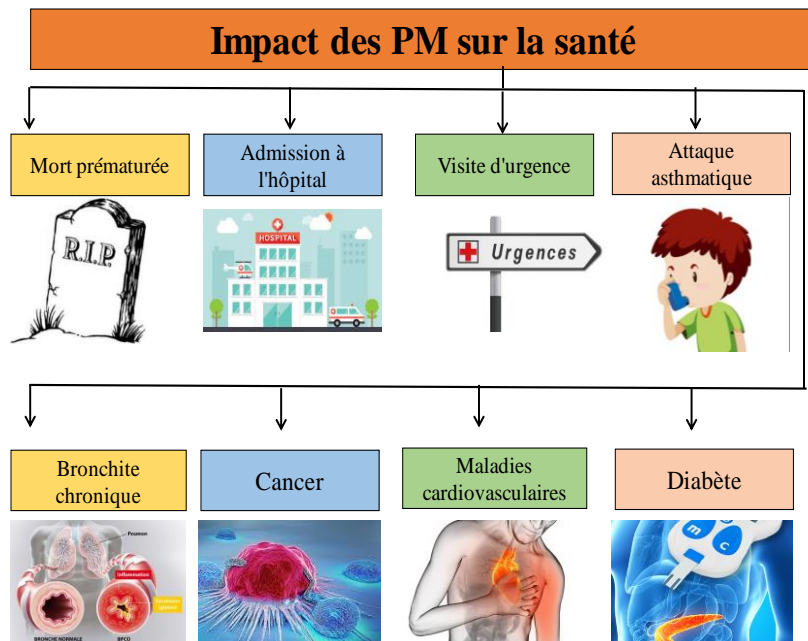


Figure 5 : Effets de l'exposition aux particules sur la santé (adapté de (Kim et al., 2015)).

2. Particules atmosphériques et système respiratoire humain

2.1. Anatomie du système respiratoire humain

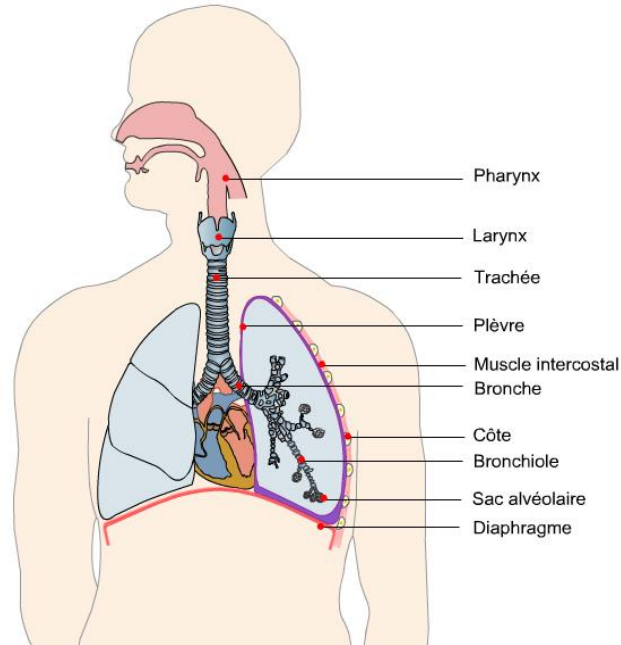


Figure 6 : Anatomie du système respiratoire humain.

La fonction principale du système respiratoire est l'apport de l'oxygène (O_2) à l'organisme et l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2), fonctionnant en collaboration avec le système cardiovasculaire. Le système respiratoire peut être divisé anatomiquement en deux parties : les voies aériennes supérieures qui regroupent les organes en dehors du thorax (voies dites exthoraciques), comme le nez, le pharynx, et le larynx, et les voies aériennes inférieures qui regroupent les organes appartenant au thorax, tels que la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles pulmonaires (**Figure 6**).

- **Le nez et la cavité nasale.**

Le nez est la seule partie visible du système respiratoire. Le nez et sa cavité nasale interne réchauffent, humidifient et nettoient l'air inhalé. À l'entrée de la cavité nasale, la paroi superficielle est constituée d'un épithélium squameux stratifié contenant des glandes sébacées et des poils nasaux (vibrisses) servant à la filtration de l'air inhalé. Dans la voie nasale principale, les parois sont tapissées d'une muqueuse respiratoire constituée à partir d'un épithélium pseudo-stratifié cilié, contenant des cellules caliciformes. Les glandes séreuses produisent et libèrent à la surface un liquide visqueux et semi-collant appelé mucus, qui

retient les particules inhalées tels que la poussière et les bactéries. Ces dernières sont détruites par les enzymes antibactériennes.

- **Le pharynx.**

Le pharynx est une structure tubulaire qui relie les cavités buccale et nasale au larynx et à l'œsophage. Il se divise en trois parties : le nasopharynx, l'oropharynx, et le laryngopharynx. Le pharynx sert de passage pour la nourriture et l'air, contrôlé par l'épiglotte, formé par un cartilage élastique couvrant la trachée durant la déglutition de la nourriture et empêchant donc le passage des aliments dans la trachée.

- **Le larynx.**

Le larynx, appelé boîte vocale, abrite les cordes vocales responsables de la production du son (phonation), et sert à la transmission de l'air de l'oropharynx à la trachée.

- **L'arbre trachéobronchiale.**

L'arbre trachéobronchiale regroupe la trachée, les bronches, et les bronchioles. La trachée est un tube creux d'environ 11 à 14 cm de long qui relie le cartilage du larynx aux bronches primaires des poumons. La bronche primaire droite se divise en trois bronches lobaires (secondaires), tandis que la bronche gauche se divise en deux. Chaque bronche lobaire sert de voie respiratoire à un lobe spécifique du poumon. À leur tour, les bronches lobaires se divisent ensuite en bronches segmentaires. Les bronches se divisent continuellement en bronches de plus en plus petits (bronchioles), jusqu'à environ 23 à 24 générations de division à partir des bronches principales. Les bronchioles respiratoires se divisent ensuite en canaux alvéolaires, sous forme de courts tubes, qui reposent sur une riche matrice de fibres élastiques et de collagène. À l'extrémité distale débouchent les sacs alvéolaires (Tu et al., 2013).

2.2. Interaction des PM avec le système respiratoire

Le système respiratoire est directement affecté par la pollution atmosphérique. Selon leur taille, les PM pénètrent plus ou moins profondément dans le système respiratoire, s'installent dans les voies aériennes supérieures ou inférieures, et y exercent leurs effets toxiques. Ces PM peuvent aussi atteindre les alvéoles pulmonaires, et même, pour les plus fines, pénétrer et/ou libérer dans la circulation sanguine les contaminants chimiques adsorbés à leur surface pour ensuite être distribués aux différents organes du corps humain (Figure 7). Plusieurs études épidémiologiques et toxicologiques ont signalé des associations entre

l'exposition au PM et la morbidité respiratoire, y compris la hausse des hospitalisations et de la fréquentation des urgences pour problèmes respiratoires divers (Peel et al., 2005).

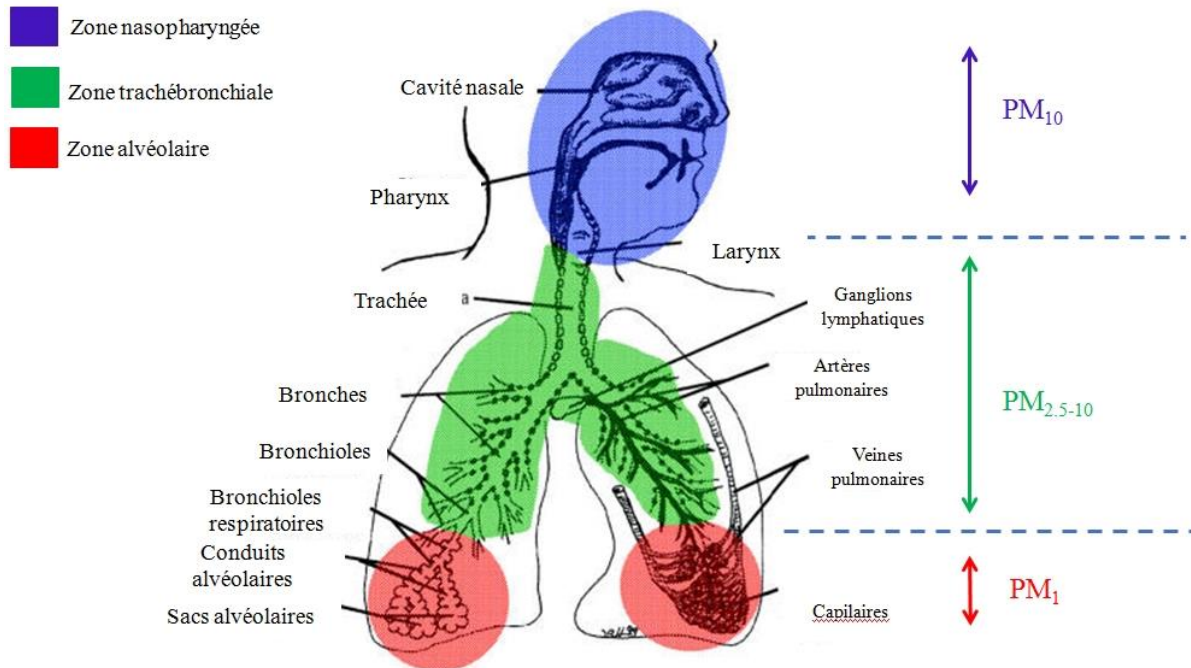


Figure 7 : Taille et dynamique des particules dans le système respiratoire humain (adapté de (Oberdörster et al., 2005)).

Une fois dans le système pulmonaire, ces PM peuvent se déposer au niveau de 3 régions distinctes : les régions nasopharyngée et trachéobronchiale où leur élimination est basée sur une clairance mucociliaire rapide (24 heures), et la région alvéolaire où leur élimination est plus lente et est réalisée par les macrophages alvéolaires. Cependant, les particules ultrafines, dans les voies les plus profondes, ont montré une capacité à échapper à la clairance macrophagiques et une d'interagir avec les cellules épithéliales pulmonaires (Chalupa et al., 2004).

2.3. Biotransformation des composés organiques adsorbés aux PM

Au sein des PM, certains composés, comme les métaux, les N- et O-HAP peuvent induire directement leurs effets toxiques, alors que d'autres composés, tels que les HAP, deviennent toxiques après une bioactivation, qui va générer des intermédiaires de dégradation actifs, qui vont eux même exercer les effets toxiques. Les composés organiques (et notamment les HAP que nous considérerons comme composés modèles en raison de leur

important potentiel génotoxique), de par leur caractère lipophile, ont la capacité de pénétrer facilement à l'intérieur des cellules.

Après pénétration, ces composés vont alors subir un processus d'activation métabolique qui a pour finalité de permettre leur excrétion cellulaire et leur élimination de l'organisme. Le processus de prise en charge peut être résumé de la façon suivante : une fois dans la cellule, les HAP se lient à leur récepteur cytoplasmique, l'aryl hydrocarboné (AhR), induisant son activation et sa migration dans le noyau, où il se liera avec une autre protéine nucléaire nommée ARNT (AhR nuclear translocator). Le nouveau complexe ainsi formé se fixe sur des régions spécifiques de l'ADN appelés "éléments de réponses aux xénobiotiques" (ERX) et induit l'expression de gènes cibles spécifiques impliqués dans le processus de métabolisation des HAP.

2.3.1. La voie du récepteur aryl hydrocarboné (*récepteur AhR*)

Le récepteur AhR (96 Da) est membre d'une famille de facteurs de transcription appelés «basic Helix–Loop–Helix Per-Arnt–Sim» (bHLH-PAS), capable de moduler l'expression des gènes cibles de manière ligand-dépendante (Denison et al., 2002), et d'induire les réponses toxicologiques des contaminants environnementaux dont les dioxines (TCDD), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que le benzo[a]pyrène, et les polychlorobiphényles (PCBs) (Puga et al., 2009; Rogers et al., 2017).

L'AhR est exprimée dans tous les tissus, mais plus particulièrement au niveau du foie, des tissus adipeux et des cellules épithéliales bronchiques. Sa forte expression au niveau pulmonaire lui confère une activité dans plusieurs processus physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, les communications inter-cellulaires, l'expression de cytokines et l'activation métabolique des xénobiotiques (Chiba et al., 2012; Wong et al., 2010). L'augmentation du niveau de l'AhR et de ses gènes cibles, ainsi que sa présence constitutive dans le noyau, sont retrouvés dans différentes tumeurs agressives tel que la glioblastoma, le cancer de peau, et le NSCLC (Liu et al., 2013; Opitz et al., 2011; Poland et al., 1982; Su et al., 2013) : ces observations font du complexe AhR/ARNT une importante cible thérapeutique pour le traitement du cancer, et des maladies auto-immunes telles que la sclérose multiple (Mascanfroni et al., 2015; Quintana et al., 2010, 2008; Veldhoen et al., 2008). En absence de ligand, le récepteur AhR se trouve dans le cytoplasme lié à des protéines chaperonnes : la protéine du choc thermique 90 (HSP90) et la protéine immunophilin Hepatitis B virus X-associated Protein 2 (XAP2) (Dietrich, 2016; Puga et al.,

2009; Rogers et al., 2017). Suite à la fixation d'un ligand, le récepteur AhR migre dans le noyau où il se dissocie des protéines chaperonnes et forme un hétérodimère avec le transporteur nucléaire AhR Nuclear Translocator (ARNT). Cette translocation entre les deux compartiments cellulaires est assurée par deux signaux : un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire (NES). Une phosphorylation des sérines 12 et 36 au niveau de la NLS permet la translocation nucléaire de l'AhR, par contre des travaux ont montré que le remplacement de ces sérines par des alanines bloque la phosphorylation et la translocation de l'AhR (Levine and Perdew, 2001). Le complexe ainsi formé AhR/ARNT, se lie ensuite au niveau des régions de l'ADN appelées éléments de réponse aux xénobiotiques (ERX), ou des éléments de réponse aux dioxines (ERD) et recrute ensuite l'ARN polymérase II, par un mécanisme non caractérisé (Puga et al., 2009) et induit la transcription des gènes impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques appartenant surtout à la famille des cytochromes tel que le CYP1A1 (Dietrich et al., 2016 ; Rogers et al., 2007) (Figure 8).

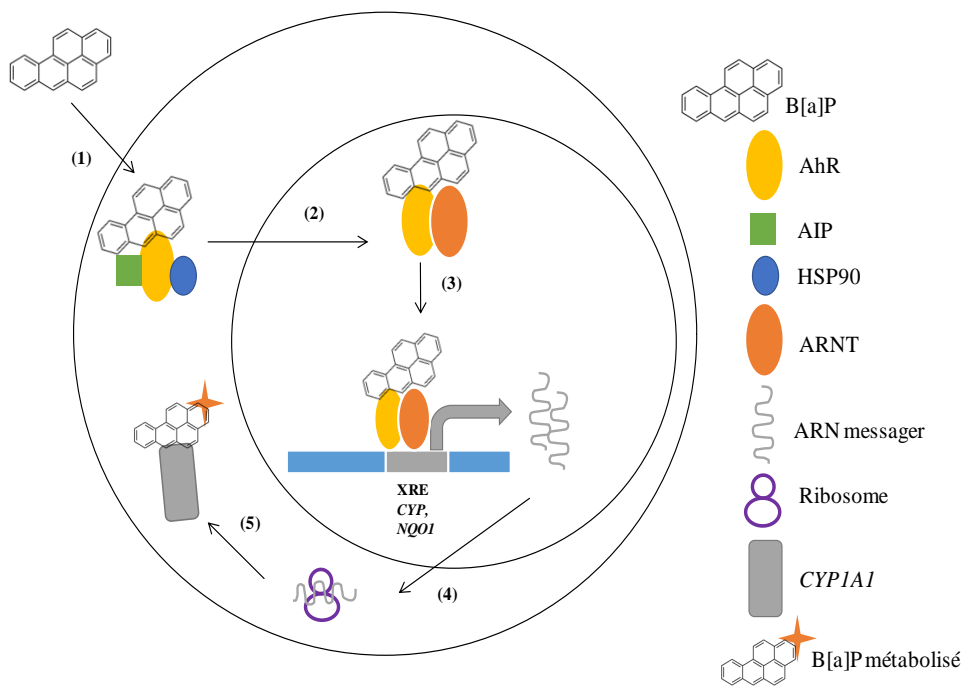


Figure 8 : Schéma simplifié de l'induction génique du CYP1A1 par le B[a]P. (1) Liaison du B[a]P à l'AhR, (2) Translocation du complexe AhR/BaP dans le noyau et dissociation de AIP et de l'HSP90 et dimérisation de l'AhR/BaP avec l'ARNT, (3) Fixation du complexe AhR/ARNT/BaP au niveau d'un élément de réponse aux xénobiotiques XRE permettant la transcription des gènes CYP, (4) Translocation de l'ARNm dans le cytoplasme et (5) traduction par les ribosomes pour donner une protéine CYP1A1, (5) Métabolisation d'une molécule de B[a]P par la protéine néosynthétisée (adapté de Denison et al., 2003).

Chiba et al. (2011) et Wong et al. (2010) ont montré la capacité du récepteur AhR à induire une expression des gènes régulant la sécrétion du mucus au niveau pulmonaire tels que les MUC5B et MUC5AC.

2.3.2. Bioactivation des HAP

Chez l'Homme, les composés organiques requièrent une activation métabolique pour exercer leur toxicité pulmonaire et sont majoritairement convertis en métabolites électrophiles très réactifs, pendant la phase I dite phase de fonctionnalisation, par la superfamille des monooxygénases à cytochromes P450 (CYP) : CYP1A1, CYP2E1 et CYP2F1 respectivement (Birben et al., 2012; Chevallier, 2013). Les CYP jouent un rôle important dans la défense cellulaire contre les composés organiques, en permettant l'introduction de groupements fonctionnels polaires sur la molécule par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Leur expression génique peut fortement varier en fonction du type de tissus et/ou de cellules considérés (Chevallier, 2013). Cependant, durant le processus de dégradation, des métabolites intermédiaires hautement toxiques peuvent être générés. Les époxydes formés subissent un réarrangement soit directement avec production de phénols, soit indirectement avec leur conversion en dihydrodiols catalysée par l'époxyde hydrolase microsomale (EHm) (Kelly and Fussell, 2012). Ces métabolites seront à nouveau oxydés par les mêmes CYP (Genies, 2017). Une fois métabolisés par les enzymes de la phase I, les intermédiaires réactifs peuvent être réarrangés pour être éliminés, ou alors exercer leurs effets toxiques. La phase de métabolisation suivante, dite de phase II, consiste en la conjugaison des métabolites hautement réactifs en métabolites plus hydrophiles, essentiellement catalysée par les glutathion S-transférases (GST) avec le greffage de composés hydrophiles endogènes qui a pour but de faciliter leur élimination de l'organisme (Genies, 2017) (**Figure 9**). L'induction de l'expression génique des CYP est assurée par le complexe de transcription AhR/ANT.

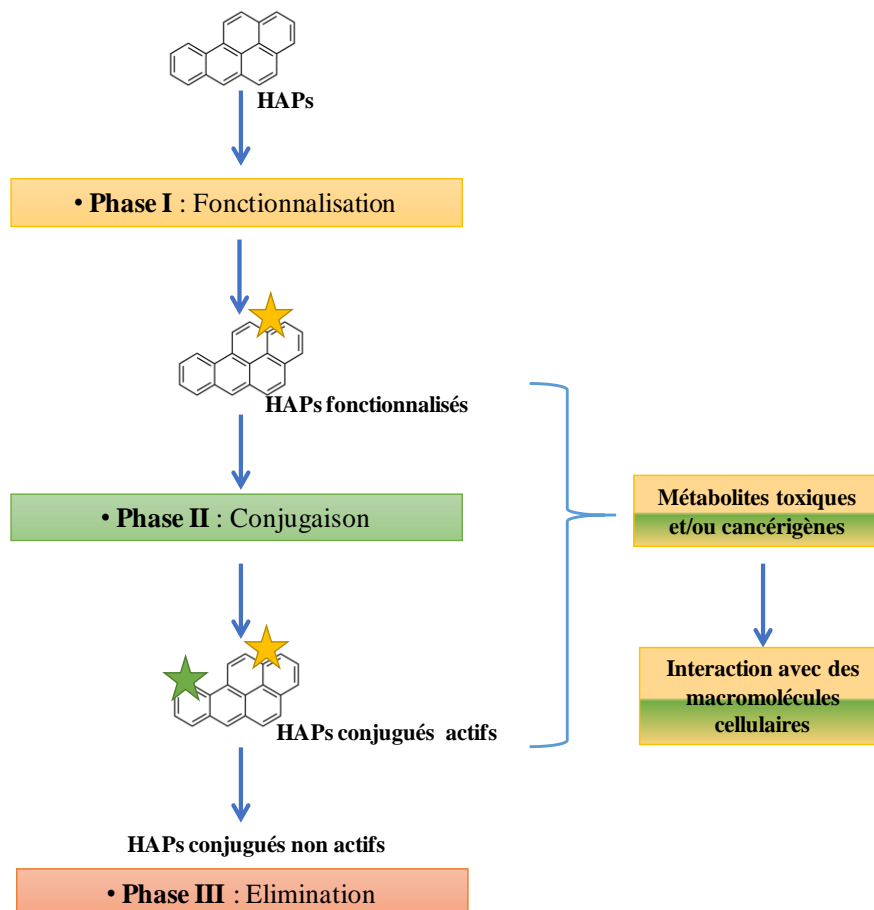


Figure 9 : Voie de l'activation métabolique des HAP (Genies, 2017).

3. Principaux mécanismes décrits dans la toxicité des PM

3.1. Le stress oxydant cellulaire

3.1.1. Définition du stress oxydant cellulaire

Le stress oxydant représente un déséquilibre entre la production et la détoxification cellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO), perturbant ainsi l'état rédox des cellules et pouvant aboutir à des processus inflammatoires, des cancers, des maladies cardiovasculaires, ainsi qu'à des désordres neurologiques suite à des dégâts cellulaires irréversibles au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (Anastasia V et al., 2019) (Figure 10).

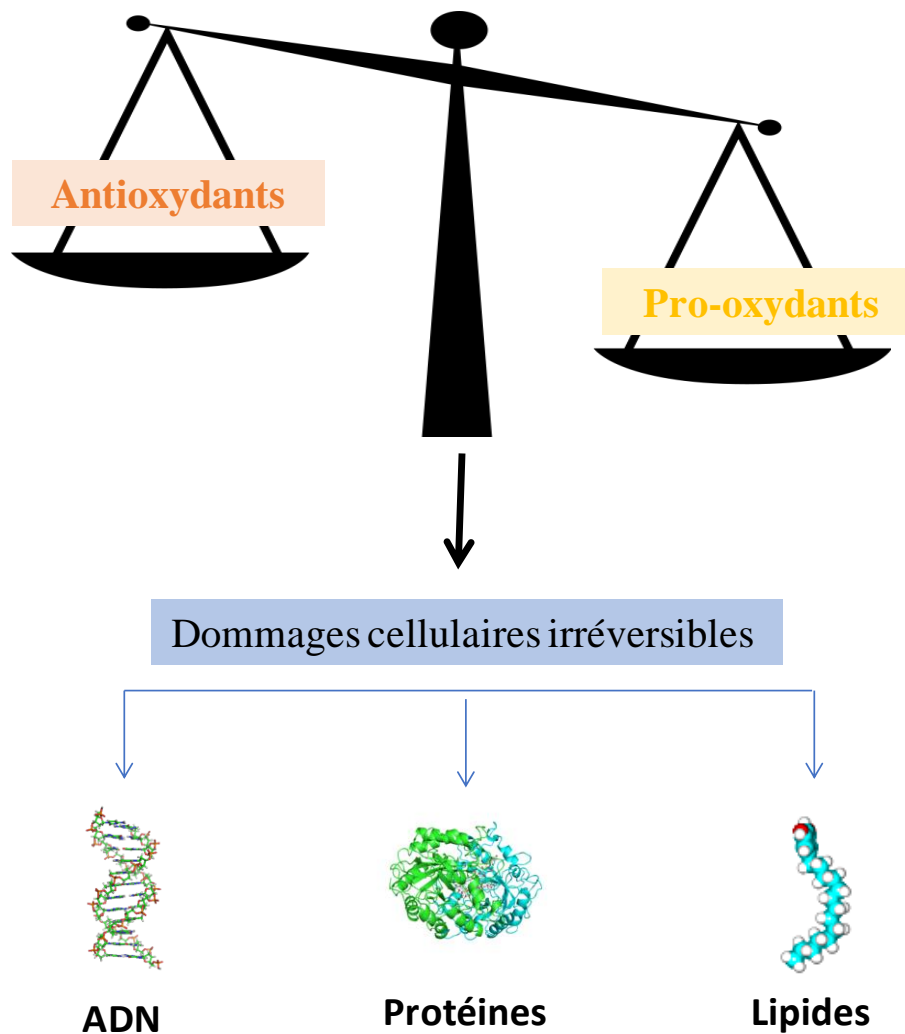


Figure 10 : Schématisation du stress oxydant : le stress oxydant représente un déséquilibre entre la production des espèces pro-oxydantes et des antioxydants cellulaires, contribuant à des dégâts irréversibles au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires.

La production des ERO dans la cellule est causée par la perturbation au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que par l'oxydation des composés chimiques par les cytochromes. La génération d'ERO via les cytochromes a provoqué un débat sur la fonction de l'AHR vis-à-vis de l'état oxydatif des cellules. Certaines études ont positionné l'AHR dans le cercle des pro-oxydants cellulaires, alors que d'autres études ont démontré une capacité antioxydante via son interaction avec les voies de détoxification cellulaire tels que la voie NRF-2 (Dietrich, 2016; Shertzer et al., 2004).

3.1.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont des molécules produites par les organismes vivants en réponse au métabolisme cellulaire normal, mais aussi suite à un stress environnemental, tels que la pollution de l'air. Les ERO sont divisées en deux groupes : les espèces radicalaires tels que OH° et ROO° , et les espèces non radicalaires tels que H_2O_2 (Apel and Hirt, 2004).

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires.

Ces systèmes ont pour objectifs de transformer les ERO en espèces moins toxiques, d'empêcher l'interaction entre espèces chimiques et de prévenir ou réparer les lésions induites par les ERO, ainsi que d'induire la synthèse des antioxydants. Ces systèmes peuvent être soit enzymatiques, soit moléculaires, d'origine endogène ou exogène et des composés naturels ou synthétiques.

3.1.3. Le système de défense non-enzymatique.

Le mécanisme de défense non-enzymatique, regroupe des composants qui ne sont pas synthétisés par l'organisme et qui doivent être apportés par l'alimentation tels que les vitamines C et E, la β -carotène, la GSH, ainsi que les oligoéléments.

3.1.4. Le système de défense enzymatique.

Le système de défense enzymatique implique l'intervention de plusieurs enzymes tels que la SOD (superoxyde dismutase), la CAT (catalase) et la GPx (glutathione peroxydase) et l'HMOX (Hème oxygénase).

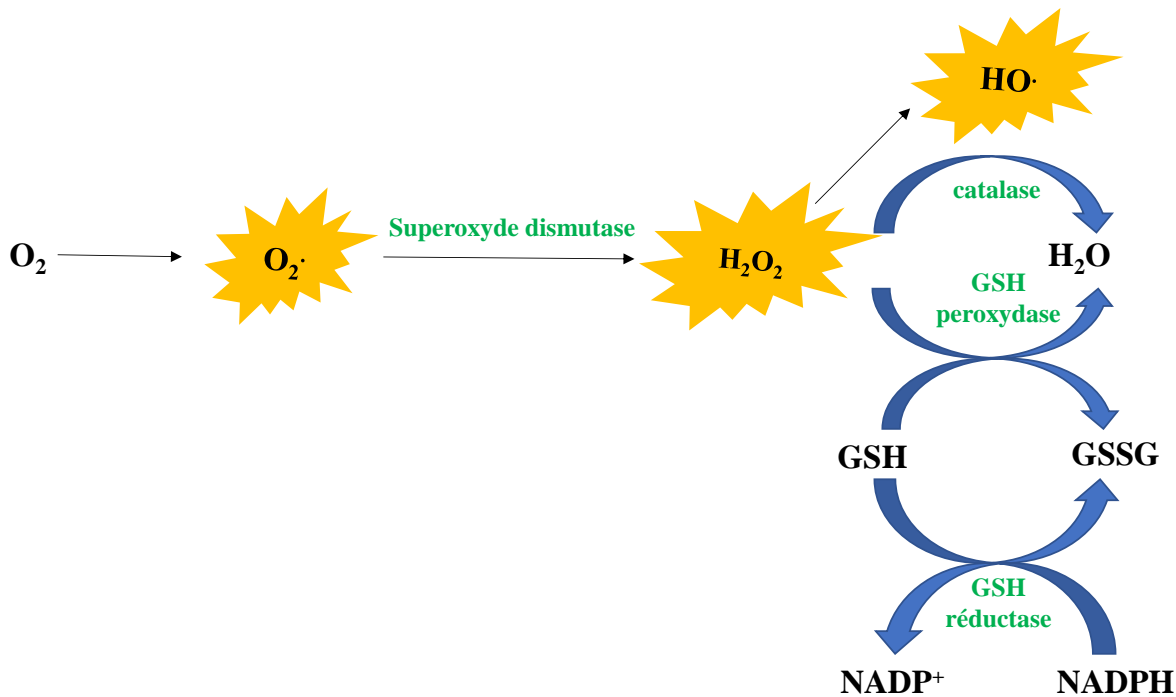


Figure 11 : Mécanisme de défense enzymatique contre le stress oxydant (adapté de (Garait, 2006)).

La superoxyde dismutase catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 . Cette enzyme métallo-dépendante existe sous trois formes (CuZn-SOD, Mn-SOD et EC-SOD), fortement exprimées au niveau des cellules pulmonaires. A son tour, la GPx accélère la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 . Au cours de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Figure 11) (Garait, 2006). L'induction de l'expression génique de ces enzymes de défenses antioxydantes est assurée par la voie de signalisation du facteur Nrf2. Le mécanisme moléculaire de cette voie sera décrit dans le paragraphe suivant.

4. La voie Nrf2 : Défense enzymatique contre les stress oxydant

Le facteur de transcription « nuclear factor erythroid-2-related factor 2 » (Nrf2) régule l'expression génique de plusieurs enzymes impliquées dans la défense anti-oxydante, comme la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1), l'hème oxygénase (HMOX) et les enzymes de l'activation métabolique de la phase II tels que le glucuronosyl transférase 1 AG (UGT1AG)

et la glutathione-S-transferase (GSTA1/2), possédant un domaine spécifique au niveau de la séquence nucléotidique : éléments de réponses antioxydants.

Dans les conditions physiologiques normales, Nrf2 est présente dans le cytoplasme liée à la protéine KEAP-1 (Kelch-like-ECH associated protein) qui va assurer sa dégradation protéosomique. De plus, comme le métabolisme cellulaire normal produit des faibles quantités d'ERO, Nrf2 possède toujours un niveau d'activation basal. Vue sa courte durée de vie ($t_{1/2}=15$ min), sa dégradation est assurée par Keap1, qui, à son tour, se déplace entre le compartiment cytoplasmique et nucléaire entraînant Nrf2 vers le cytoplasme et aboutissant à sa dégradation par la suite (Nguyen et al., 2003). Par contre, dans le cas de stress oxydant, le temps de demi-vie de NRF2 passe de 15 à 30 min, ce qui renforce sa présence dans le noyau et inhibe sa dégradation par KEAP-1, en plus de la dégradation protéosomique de KEAP-1 induite par les ERO. Ces deux mécanismes vont donc favoriser l'expression des gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydant.

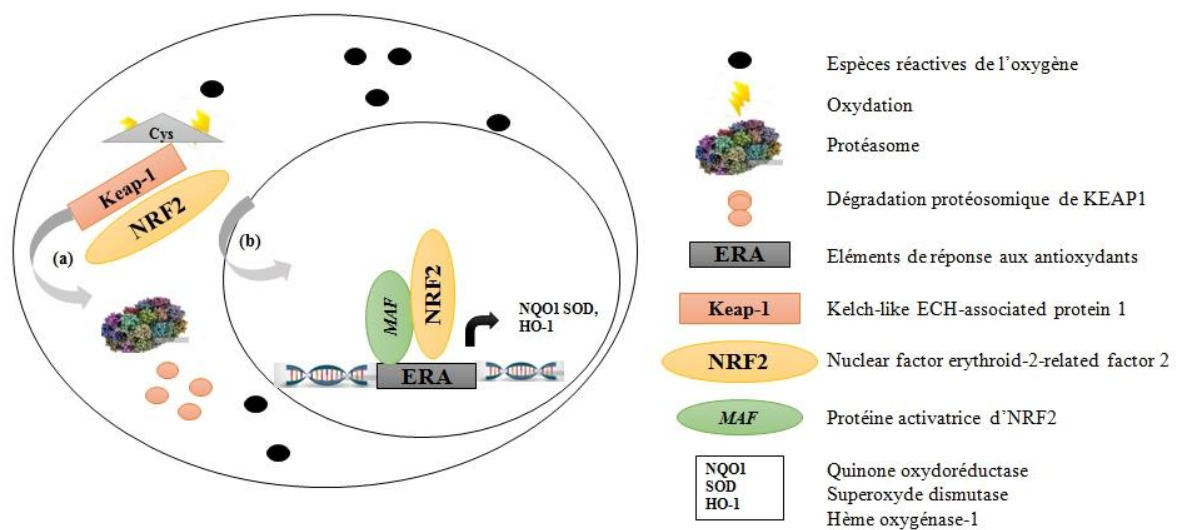


Figure 12 : Voie de signalisation de la protéine Nrf2. L'augmentation du niveau d'ERO va induire l'oxydation des résidus cystéines sur Keap-1. Cette oxydation va permettre la dégradation protéosomique de Keap-1 (a) et la translocation nucléaire de Nrf2 (b) où elle va se lier au niveau des régions spécifiques de l'ADN et induire l'expression des gènes d'enzymes de défense anti-oxydante.

Une augmentation du stress oxydant/électrophile, conduit à l'oxydation des résidus cystéines sur Keap1 et à l'inhibition de l'activité de l'E3 ubiquitin Ligase. Nrf2 se dissocie ainsi de Keap1 et migre dans le noyau où il se dimérise avec Maf et c-jun. Le complexe ainsi formé se lie à son tour au niveau des ERA (éléments de réponse aux antioxydants) et induit l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans les défenses antioxydantes, qui sont donc à la fois cibles du récepteur AhR et de Nrf2. Sa dégradation est par la suite

assurée par Keap1, qui transporte Nrf2 vers le cytoplasme, lieu de sa dégradation (Bortoli et al., 2018) (Figure 12).

5. Dommages cellulaires causés par les ERO

Les espèces réactives de l'oxygène produites durant la biotransformation des HAP ou bien générées par les métaux de transition tels que le Cu, Zn, Cr, Mn et Fe (toxicité directe ou réaction de Fenton) (Bernstein et al., 2004) induisent des dommages cellulaires très graves, allant de l'oxydation des protéines et des lipides, jusqu'à l'attaque de l'ADN (Showkat et al., 2019).

5.1. Oxydation des protéines

Etant donné que les protéines représentent les composés majoritaires dans la plupart des systèmes biologiques, elles sont des cibles importantes des ERO. L'oxydation des protéines contribue à la formation de nombreux produits, parmi lesquels les protéines carbonylées. Le processus de formation de la protéine carbonylée est un processus non enzymatique et irréversible. L'oxydation des protéines peut se réaliser directement en interagissant avec les ERO ou indirectement suite à l'interaction avec des macromolécules cellulaires déjà oxydées tels que le malondialdéhyde (MDA), produit d'oxydation des lipides. Cette oxydation provoque un changement de conformation des protéines entraînant une inactivation partielle ou totale et en cas d'oxydation très forte.

5.2. Peroxydation des lipides

Les lipides sont des cibles majeures des radicaux libres. La peroxydation lipidique est une caractéristique du stress oxydatif pouvant endommager les membranes cellulaires en perturbant l'organisation de la membrane, en altérant sa fluidité, sa perméabilité et son intégrité. La peroxydation des lipides induite par les radicaux libres suit un mécanisme en chaîne qui implique trois événements que sont l'initiation, la propagation et la terminaison.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) biologiquement importants, tels que l'acide linoléique (LA), l'acide arachidonique (AA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont tous sujets de la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres, donnant lieu à une gamme diversifiée de produits. Les taux d'oxydation de ces molécules ont été systématiquement étudiés et dépendent du nombre de centres -CH₂- dans la

molécule qui sont flanqués de deux doubles liaisons (méthylènes bisallyliques). Ainsi, l'oxydabilité des acides gras courants est la suivante, de la plus faible à la plus importante : acide linoléique < acide arachidonique < acide eicosapentaénoïque (EPA) < acide docosahexaénoïque (DHA).

Les hydroperoxydes lipidiques sont les principaux produits de la peroxydation des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres. Des produits d'oxydation plus complexes, généralement appelés produits d'oxydation secondaires, sont générés à partir de la peroxydation de l'acide arachidonique catalysée par des radicaux libres non enzymatique et d'autres AG hautement insaturés. Les produits d'oxydation secondaires comprennent une série de produits de type prostaglandine (PG) appelés isoprostanes (IsoPs) ainsi que des peroxydes monocycliques et cycliques en série. Suite à l'élimination d'un hydrogène bi-allylique, et l'addition d'une molécule d'oxygène, un radical peroxyde (ROO°) se forme, subit une cyclisation et une addition d'une nouvelle molécule d'oxygène, contribuant à la formation d'un bicycloendoperoxyde, composé instable, directement réduit en isoprostane. La nomenclature des différentes familles d'isoprostanes est basée sur le numéro de carbone où se positionne la chaîne hydroxyle. Fait important, les IsoPs sont considérés comme des biomarqueurs «standard» et stables de la peroxydation lipidique endogène et du stress oxydatif (Chandra et al., 2016; Milne et al., 2011). Des taux élevés de ces composés dans les fluides et les tissus sont associés à des maladies tels que l'obésité, l'asthme, le diabète, et à certains types de cancers.

5.3. Dommages à l'ADN

Le métabolisme cellulaire normal produit naturellement des ERO. D'autre part, l'environnement soumet en permanence l'organisme à différentes agressions telles que le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes ou les agents génotoxiques. Parfois même, des molécules toxiques pour l'ADN sont utilisées comme outil thérapeutique, notamment en chimiothérapie.

Parmi toutes les bases de la purine et de la pyrimidine, la guanine est la plus sujette à l'oxydation. Lors de l'oxydation, un groupe hydroxyle est ajouté à la 8ème position de la molécule de guanine donnant ainsi le produit modifié par oxydation qui est la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG). Suite à cette oxydation, la base guanine va se désappairer de la base thymine et induire une transversion de GC à TA. La 8-OHdG est donc un marqueur biologique spécifique du stress oxydant et des dommages à l'ADN.

Dans toute cellule vivante, l'ADN endommagé est réparé par voie enzymatique afin de retrouver sa fonction normale, alors que l'ADN mal ou non réparé peut entraîner des mutations (substitution de bases, délétions et fragmentation de brin) conduisant à la cancérogenèse. Ainsi, pour maintenir l'intégrité du génome, les cellules eucaryotes ont mis en place des voies de signalisation activées en réponse à des dommages à l'ADN, permettant soit l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, soit l'induction de l'apoptose, la mort cellulaire programmée.

En cas de dommage à l'ADN, les senseurs ATR (ATM et rad3- related ATR) et ATM (ataxia-télangiectasia-mutated) phosphorylent un certain nombre de protéines en aval, telles que Chk-1, Chk-2 et P53, permettant l'arrêt du cycle cellulaire, afin de fournir le temps à la cellule de réparer son ADN, mais aussi d'induire l'apoptose dans le cas de cellules à lésions graves (**Figure 13**). Globalement ATR et ATM phosphorylent respectivement Chk1 et Chk2. Chk1 est activée après une lésion simple brin, alors que Chk2 est induite suite à des lésions double brin de l'ADN ([Stolz et al., 2011](#)).

Bien que P53 contribue à l'arrêt du cycle cellulaire, cette protéine doit être faiblement exprimée et de manière constante, afin de maintenir le fonctionnement cellulaire. C'est pourquoi MDM2 va assurer un rétrocontrôle négatif de P53 permettant à la fois la disponibilité de P53 et le bon fonctionnement cellulaire.

L'exposition aux particules atmosphériques est associée à plusieurs impacts sur la santé humaine, pouvant même aboutir à un cancer pulmonaire ([Karlsson et al., 2004](#)).

Une étude épidémiologique a montré qu'une augmentation de concentration de particules fines de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ induit une augmentation de 8% du risque de mortalité par le cancer pulmonaire ([Pope III et al., 2002](#)). Vu la complexité des particules atmosphériques, l'identification et le rôle des composés responsables de l'effet génotoxique n'est pas encore clairement élucidé. Des études suggèrent le rôle des HAP, et donc de la fraction organique ([Binková et al., 2003](#); [Topinka et al., 2000](#)), alors que d'autres études suggèrent le rôle de métaux hydrosolubles ([Prahalad et al., 2001](#)) et non-hydrosolubles ([Ghio et al., 1999](#); [Knaapen et al., 2002](#)) dans l'initiation du stress oxydant et des dommages à l'ADN.

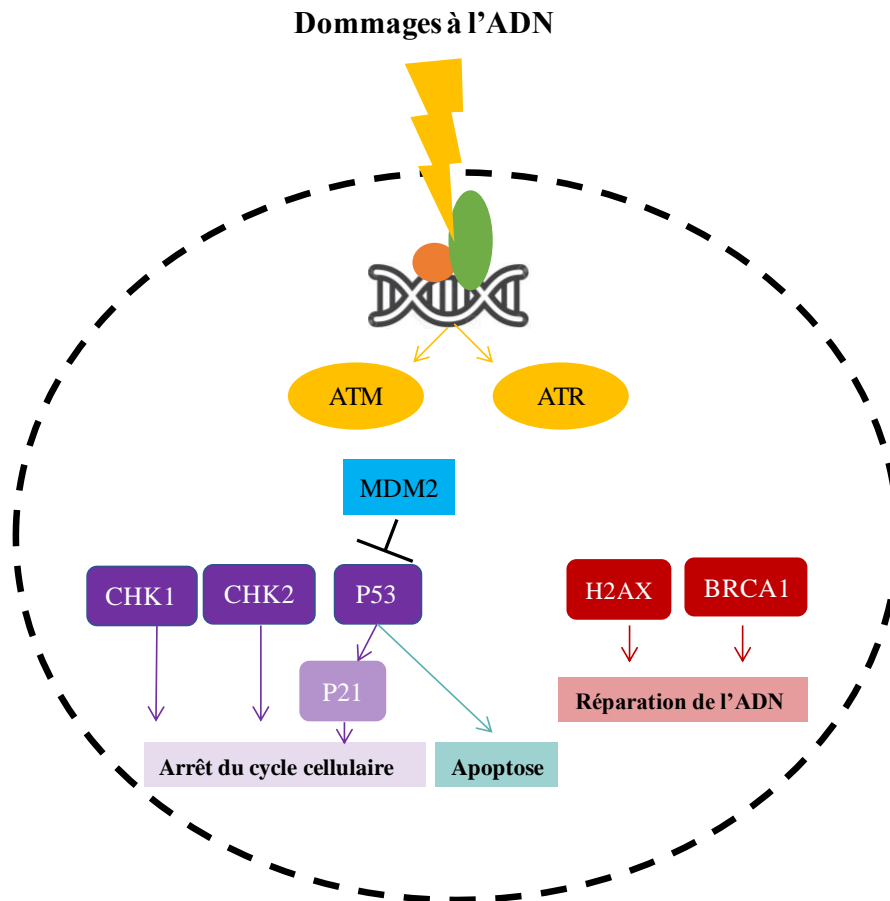


Figure 13 : Mécanisme d'induction des dommages à l'ADN et de génotoxicité.

6. Interaction entre les voie AhR et Nrf2

Un chevauchement existe entre les deux voies AhR et NRF2 puisque les promoteurs de certains gènes cibles, tels que NQO1, GSTA4 et UGT1A6, contiennent à la fois les régions ERX et ERA, et par conséquent, l'induction de ces gènes est assurée par les 2 voies.

Deux mécanismes différents sont responsables de l'induction de NRF2 par l'AhR (**Figure 14**). Le premier consiste en une activation transcriptionnelle directe de Nrf2 par l'AhR, alors que le deuxième mécanisme consiste en une induction indirecte, via la production des espèces réactives de l'oxygène.

Le deuxième mécanisme assuré par les ERO, implique la biotransformation des composés organiques par le CYP1A1. Cette bioactivation va générer des ERO, qui vont à leur tour oxyder les résidus cystéiniques au niveau de KEAP1 et provoquer la translocation de NRF2 dans le cytoplasme.

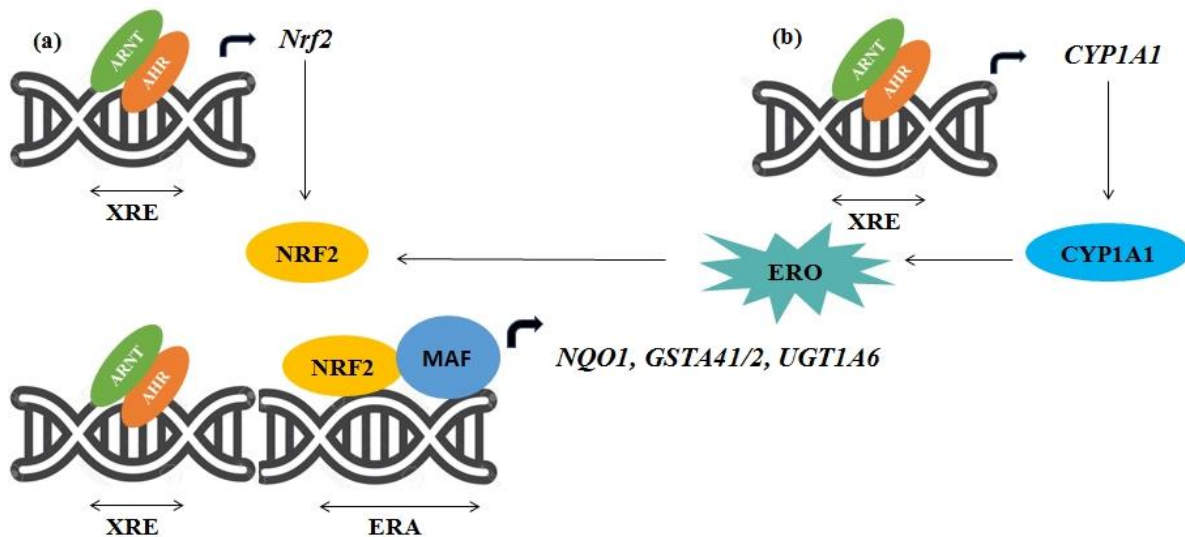


Figure 14 : Induction de la voie Nrf2 par l’AhR via son induction transcriptionnelle directe (a) ou (b) indirectement suite à la génération des espèces réactives de l’oxygène.

7. Inflammation

L’inflammation est un processus physiologique de défense, par lequel l’organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. L’inflammation est une réaction généralement bénéfique pour l’organisme puisqu’elle lui permet de se défendre contre une agression et de réparer, dans un deuxième temps, le tissu lésé. On parle dans ce cas de réponse inflammatoire « aigüe ». Mais si la réponse inflammatoire persiste dans la durée, on parle alors de réponse inflammatoire ou d’inflammation « chronique ». Dans ce cas, la réaction inflammatoire devient défavorable et contribue à l’installation de pathologies et doit alors être contrôlée à l’aide de médicaments.

La réponse inflammatoire implique l’interaction de nombreux médiateurs tels que les médiateurs d’origine cellulaire locale (sérotonine, histamine et prostaglandines), des médiateurs d’origine plasmatiques (produits du complément C3b, facteur de coagulation tels que la fibrine), ainsi que des médiateurs d’origine cellulaire tels que les cytokines.

Les cytokines sont des protéines de petit poids moléculaire (8 à 40 kD), impliquées dans l’inflammation et les réponses immunitaires. Ces cytokines sont soit des cytokines pro-inflammatoires capables donc d’induire l’inflammation, ou des cytokines anti-inflammatoires, qui ont pour rôle de limiter ce processus. Ainsi, l’inflammation est contrôlée, dans des conditions normales, par la balance pro- et anti-inflammatoire.

Les différentes cytokines sont classées en plusieurs catégories, selon leur fonction, ou selon le type cellulaire par lequel elles sont secrétées. On distingue les interleukines (IL), les chimiokines, les interférons (INF), les facteurs de nécroses tumorales (TNF) et les facteurs stimulant les colonies (CSF).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 qui interviennent dans la phase aigüe de l'inflammation.

Les particules atmosphériques sont connues pour leur effet pro-inflammatoire (Gualtieri et al., 2010; Leclercq et al., 2016; Veranth et al., 2004). Des études se sont intéressées à lier cet effet pro-inflammatoire à la présence des métaux, de composés organiques, mais aussi à la présence des molécules d'origines biologiques, notamment les endotoxines en fonction de la taille des PM.

Des études *in vitro* et *in-vivo* montrent que la réponse inflammatoire est plus importante suite à l'exposition aux PM₁₀ comparée aux PM_{2.5} (Cachon et al., 2014). Ceci est probablement lié à la composition en micro-organismes et donc à la présence d'endotoxines, majoritairement retrouvées dans les particules les plus grossières (Huang et al., 2014; Monn and Becker, 1999). Ainsi, une inhibition du récepteur des endotoxines, Toll-like receptor-2 (TLR-2) a été associée à une diminution de la production de IL-8 par les macrophages alvéolaires (Becker et al., 2005a, 2005b).

D'autre part, des études ont attribué un effet pro-inflammatoire aux métaux associés aux PM : une augmentation de la production de TNF- α , IL-6 et IL-8 a été mise en évidence, en lien à la présence des métaux lourds Cu, Zn et Ni, mais aussi des métaux de transitions Al, Fe et Mn (Schaumann et al., 2004; Shao et al., 2018).

Les composés organiques tels que les HAP constituent une part importante de la masse de particules formées par combustion (Schwarze et al., 2006). Il a été montré lors d'une étude menée sur des particules diesel, connues pour leur forte teneur en HAP, que ces composés sont capables de générer des réactions pro-inflammatoires (Diaz-Sanchez, 1997; Bonvallot et al., 2001; Nel et al., 2001).

Il apparaît donc que la contribution des différents constituants d'une particule dans le processus inflammatoire n'est pas clairement identifiée : vraisemblablement l'association de tous les composés, mais aussi les caractéristiques physiques de la particule dictent les effets biologiques.

8. AhR, NRF2 et inflammation

L'AhR est clairement impliqué dans les phénomènes inflammatoires, et est exprimé dans la plupart des cellules montrant une inflammation (Fuji-Kuriyama and Kawajiri, 2010; Kerkvliet, 2009). Des études *in vitro* et *in-vivo* montrent qu'un traitement par un ligand de AhR comme la TCDD, induit les gènes de l'inflammation, tels que ceux codant pour les cytokines pro-inflammatoires IL-6, RANTES et TNF- α (Kim et al., 2012). En effet, des ERX ont été mis en évidence dans les promoteurs de ces gènes. L'activation de l'AhR par TCDD a plusieurs effets, dont l'immunosuppression profonde, des altérations intenses de la lignée des thymocytes, des modifications des fréquences du sous-ensemble de cellules immunitaires et une sécrétion aberrante de cytokines (Kerkvliet, 2009; Lawrence et al., 2006; Mandal, 2005).

Par contre, d'autres études ont montré un effet contraire de l'AhR dans les maladies pulmonaires. L'asthme est une maladie inflammatoire pulmonaire, caractérisée par un grand nombre d'éosinophiles, et des taux élevés des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. Plusieurs études ont montré que l'activation de la voie de l'AhR pourrait être bénéfique en cas d'asthme. L'exposition aux TCDD a montré une réduction de la sensibilité aux allergènes (Tarkowski et al., 2010), une diminution de la bronchoconstriction, ainsi qu'une diminution des taux de IL-5 et d'éosinophiles (Luebke et al., 2001). Alors que dans le cas de la BPCO induite par les ERO, les métalloprotéases et les cytokines, une activation de l'AhR par les TCDD implique une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) et l'expression des gènes impliqués dans la sécrétion du mucus (Mucin-5-A) (Wong et al., 2010). De même, une activation de l'AhR par des ligands possédant une plus faible affinité que la TCDD, montre une atténuation de l'inflammation, conférant ainsi à l'AhR un rôle protecteur du poumon (Shivanna et al., 2011).

D'autres études ont montré la suppression de l'inflammation via l'AhR, mais cette fois de manière indépendante des ERX via la régulation des microRNA (miRNA), qui lui confèrent un potentiel post-transcriptionnel sur les protéines exprimées au cours de l'inflammation (Lau et al., 2010; Lee and Ambros, 2001; Rogers et al., 2017). Ces contradictions montrent la nécessité de mieux comprendre et d'évaluer l'effet des différents ligands sur l'activité de l'AhR, ainsi que d'approfondir les études sur les miRNA dépendante de l'AhR et impliqués dans la diminution de l'inflammation dans certaines pathologies respiratoires.

Au cours de la réaction inflammatoire, les médiateurs produits, tels que les cytokines, les chimiokines et les prostaglandines, vont activer une cascade de signalisation cellulaire et de facteurs de transcription en lien avec ce processus, tel que la voie NFK- β .

La voie Nrf2 régule l'expression génique des enzymes impliquées contre le stress oxydant tel que l'hème oxygénase (HO-1), qui protège la cellule non seulement par son pouvoir oxydant, mais aussi par son pouvoir anti-inflammatoire (Kim et al., 2010). Lorsque la cellule est en état de stress oxydant, NFK- β est activé et induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que la TNF- α , IL-6, iNOS, et IL1- β . En revanche, cet état de stress va activer la voie Nrf2, et inhiber NFK- β , et donc inhiber par la suite l'effet pro-inflammatoire. L'effet protecteur anti-inflammatoire via Nrf2 et HO-1 est schématisé sur la Figure 15 (Ahmed et al., 2017).

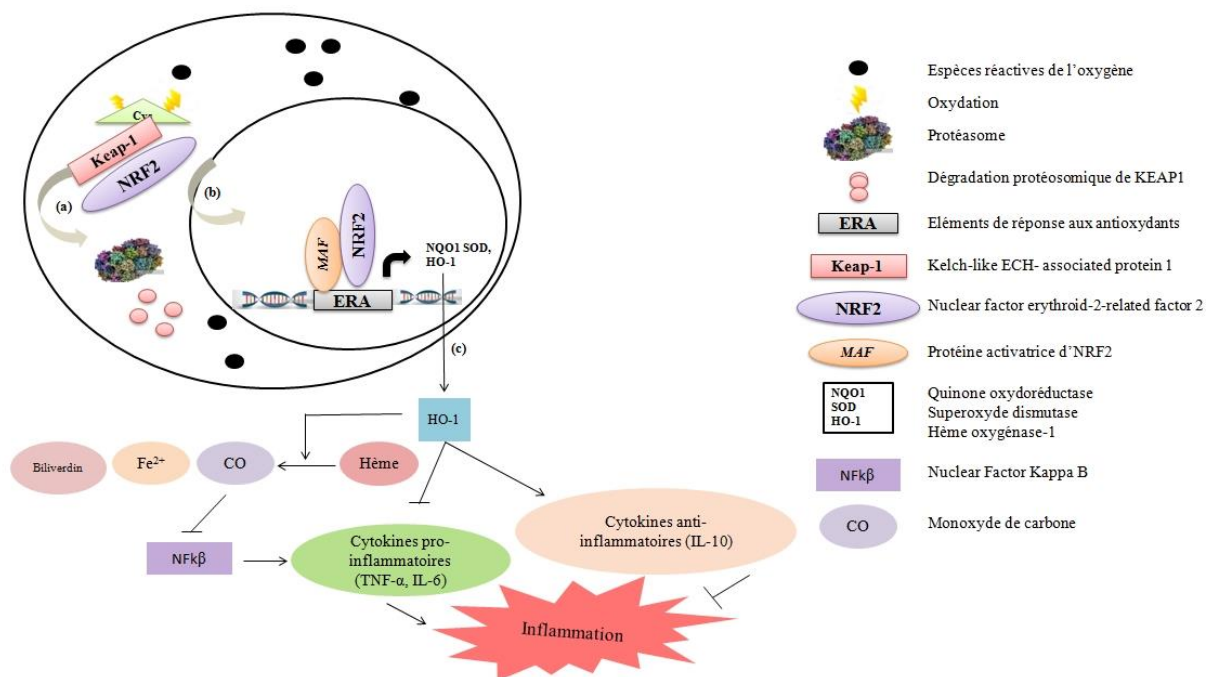


Figure 15 : Voie de signalisation NRF2-HO-1 et effet sur l'inflammation (adapté de (Ahmed et al., 2017)). Dans les conditions basales (a), Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par Keap-1. Suite à un état de stress oxydant, Keap-1 est oxydé et (b) Nrf2 est libéré et migre dans le noyau où la protéine se lie à d'autres protéines et induit l'expression génique des enzymes impliquées dans la diminution de ce stress. Parmi ces enzymes HO-1 (c) qui aussi est impliqué dans la réaction anti-inflammatoire via l'inhibition du facteur NFK β , et donc l'inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, mais aussi via l'induction de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires.

9. Les modalités de la mort cellulaire

Suite aux différentes agressions cellulaires et selon le taux de dommages oxydatifs et inflammatoires, la cellule peut soit entrer dans un état de prolifération excessive, soit se diriger vers la mort cellulaire.

La mort cellulaire se décline selon trois modes distincts à savoir l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. En l'absence de régulation, on définit la mort cellulaire comme nécrotique alors qu'en présence de régulation, on la qualifie de mort cellulaire programmée. Il existe deux voies majeures de mort cellulaire programmée (Programed Cell Death : PCD) : apoptose ou PCD de type I et mort autophagique ou PCD de type II. Ces PCD sont gérées par des cascades d'activation différentes pouvant se recouper à plusieurs niveaux.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'induction de l'apoptose et l'autophagie suite aux expositions aux particules atmosphériques. Nous allons présenter ci-après les trois types de mort cellulaire en insistant davantage sur ceux de l'apoptose et de l'autophagie qui reste le mécanisme le moins documenté.

9.1. La nécrose

La nécrose est un type accidentel de mort cellulaire non programmée, en réponse à une perte de l'intégrité cellulaire (Navarro-Yepes et al., 2014), suivie d'une libération incontrôlée de produits de la mort cellulaire dans l'espace extracellulaire, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire. Elle survient dans des maladies de types inflammatoires, neurodégénératives, cardiaques, ainsi que durant les ischémies neuronales, la dystrophie musculaire, ou dans les cellules apoptotiques ne pouvant pas être englouties par les phagocytes : c'est le cas de la nécrose secondaire (Kroemer et al., 2009).

Les caractéristiques morphologiques typiques de la mort cellulaire nécrotique qui concerne majoritairement les cellules eucaryotes, comprennent le gonflement des mitochondries ainsi que la rupture des lysosomes et de la membrane plasmique (Navarro-Yepes et al., 2014).

9.2. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus par lequel des cellules s'autodétruisent sous l'impulsion d'un signal. La mort cellulaire est un phénomène naturel,

génétiqumment programmé, qui permet l'élimination des cellules inutiles. L'apoptose peut être déclenchée selon deux voies (**Figure 16**) :

- La voie extrinsèque est initiée suite à la fixation des ligands de mort, tels que FasL, TNF- α et Apo-2/TRAIL au niveau de leurs récepteurs de morts spécifiques. La fixation des ligands et l'activation des récepteurs vont entraîner la formation de complexe multiprotéique, le DISC (Death inducing signaling complexe), qui à son tour va cliver et activer la pro-caspase-8 en caspase-8. Cette dernière clive et active les caspases effectrices 3 et 7 (**Landes, 2009**).
- La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, implique la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des molécules inter-membranaires dans le cytosol. Ces molécules vont par la suite activer les caspases et engendrer l'apoptose.

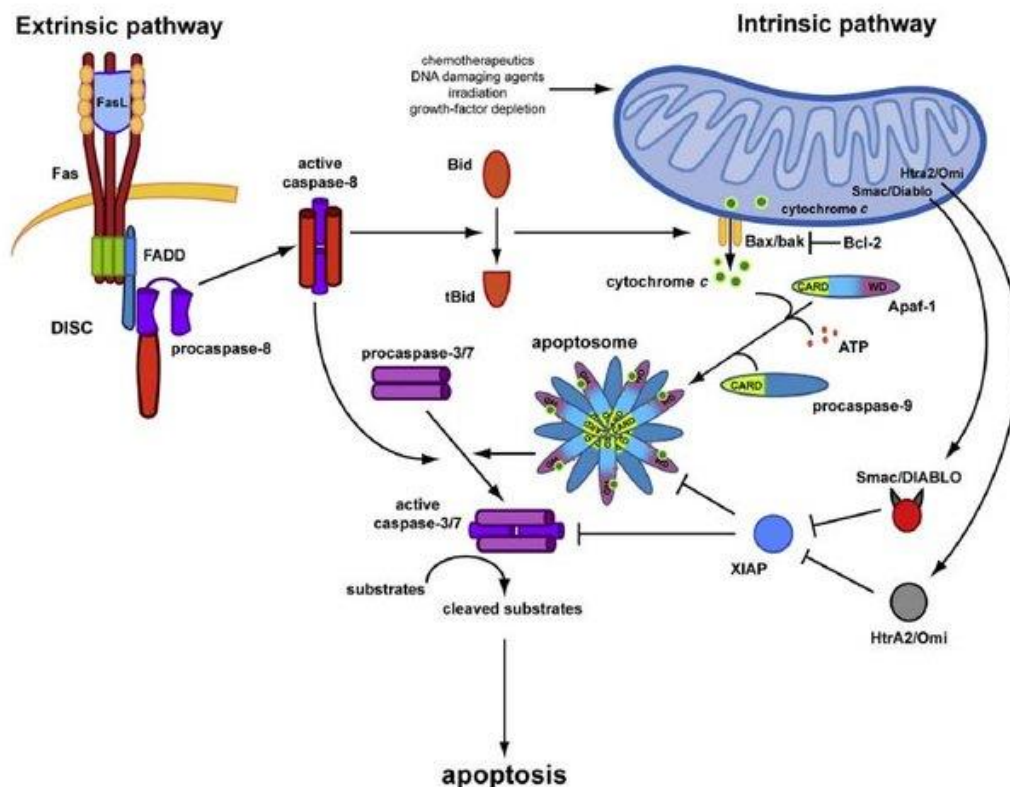


Figure 16 : Induction de l'apoptose par voie intrinsèque et extrinsèque (**Lamkanfi and Dixit, 2010**).

Parmi les molécules relarguées de l'espace inter-membranaire mitochondrial, nous pouvons citer le cytochrome c, Smac/diabolo (Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP Binding protein of Low PI), et le facteur AIF (apoptosis inducing factor). Suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le cytochrome c libéré se lie à l'APAF-1 (apoptosis protease-activating factor) formant une structure appelée apoptosome.

L'apoptosome est responsable du recrutement de la caspase 9 et son auto-activation. Par la suite, la caspase 9 va cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7. Quant au complexe smac/diablo, il va interagir dans le cytoplasme avec une protéine appelée IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) qui a pour rôle d'inhiber les caspases. Cette interaction va inhiber IAPs et activer les caspases. Alors que l'AIF, une fois dans le cytoplasme, va migrer dans le noyau et induire la fragmentation de la chromatine.

9.3. L'autophagie cellulaire

L'autophagie est un mécanisme cellulaire, permettant de produire de l'énergie, ainsi que de préserver l'homéostasie et la viabilité cellulaire (Nakashima et al., 2019 ; Cooper., 2018). Elle agit en dégradant les organelles endommagées, ainsi que les protéines agrégées, dont l'accumulation induit des effets délétères tels que l'endommagement tissulaire, des organismes et des systèmes biologiques (Navarro-Yepes et al., 2014). Ce processus a été observé pour la première fois dans les années 1960, mais la connaissance du phénomène est restée limitée jusqu'aux travaux du professeur Yoshinori Ohsumi, un biochimiste japonais, qui a, dans les années 1990, a mené des expériences brillantes sur les levures et a identifié les gènes de l'autophagie (atg = AuTophagy) (Figure 17). Les travaux de ce professeur ont été récompensés par le prix Nobel de médecine en 2016.



Figure 17 : Yoshinori Ohsumi, spécialiste en biologie cellulaire, a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2016, pour ses découvertes sur les mécanismes de l'autophagie.

Plusieurs formes d'autophagie ont été distinguées : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes, l'ADN-ARN autophagie, et la macroautophagie qui reste la forme la plus étudiée. La macroautophagie (autophagie), existe à un niveau basal et permet le maintien de l'homéostasie cellulaire, en recyclant le contenu cytoplasmique. Ce processus est très dynamique et rapide, estimé par Eskelinen en 2005, de 8 min entre la

formation et la dégradation de l'autophagosome (Eskelinen, 2005). L'autophagie qui a été décrite comme un système de dégradation non sélectif, isolant un contenu cellulaire d'une manière aléatoire afin de fournir l'énergie essentielle à la cellule, est depuis quelques années caractérisée par un système de dégradation sélectif faisant intervenir des protéines spécifiques : les récepteurs de l'autophagie qui constituent un lien entre les protéines à dégrader et les autophagosomes, telle que la protéine P62/sequestosome (Ryter and Choi, 2015).

9.3.1. La signalisation moléculaire de l'autophagie

L'autophagie se déroule en plusieurs étapes : l'initiation, l'élongation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome.

a. L'initiation

L'initiation de l'autophagie débute par un réarrangement des composants membranaires (protéines ATG = Autophagy related genes), originaire essentiellement du réticulum endoplasmique (RE), mais aussi d'autres membranes subcellulaires tels que les endosomes, l'appareil de golgi, et la membrane mitochondriale, formant une bicouche lipidique appelée « Phagophore ». Cet assemblage a lieu dans un endroit bien spécifique, le « Phagophore Assembly Site » (PAS).

L'initiation de l'autophagie nécessite l'intégration de plusieurs complexes : mTORC1, ULK, et PI3k-III, formés de plusieurs sous-unités (Tableau 3). mTORC joue un rôle de senseur de l'état énergétique de la cellule. Cette protéine est une sérine / thréonine kinase, elle-même régulée par phosphorylation et possède une influence négative sur le processus de l'autophagie.

Dans les conditions physiologiques normales, mTORC actif, phosphoryle et séquestre le complexe ULK1-FIP200-ATG13-ATG101 (Hosokawa et al., 2009). Suite à des conditions énergétiques défavorables, l'AMPK, est activée, conduisant à la phosphorylation et l'inhibition de mTORC. L'inhibition de mTORC est suivie de sa dissociation d'ULK1-mATG13 et FIP200 et à leur déphosphorylation (Figure 18). ULK1 peut par la suite s'auto-phosphoryler en position activatrice et phosphoryle par la suite ATG13 et FIP200. AMPK peut aussi s'associer à ULK et l'activer par phosphorylation (Zhang et al., 2015).

Tableau 3 : Liste des différents complexes protéiques impliqués dans l’initiation de l’autophagie cellulaire.

Complexe	Sous-unités	Abréviation
mTORC1 : mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1	mammalian target of rapamycin	Kinase mTOR
	Regulatory Associated Protein of mTOR	Raptor
	mTOR associated protein LTS8 homolo	mLST8
	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	Deptor
	Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa	PRAS40
ULK : UNC-51-Like Kinases	UNC-51-Like Kinases	ULK1/2
	AuTophagy related gene 13	Atg 13
	Focal adhesion Kinase	FIP200
	AuTophagy related gene 101	Atg101
PI3K-III: Phosphatidylinositol 3-kinase, classe III	Vascular protein sorting 34	VPS34
		P150
		Beclin-1
	Autophagy related gene 14	Atg14
	Activating Molecule in Beclin1 related autophagy protein1	Ambra1

Le fonctionnement de ce complexe est indispensable pour l’initiation de l’autophagie (Ganley et al., 2009) : il semble agir sur le recrutement des protéines nécessaires à la formation de l’autophagosome vers des compartiments spécifiques du réticulum endoplasmique appelés omégosomes et qui serviront de base pour la formation du phagophore.

Dans les étapes précoces de l’autophagie, la présence des phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) est indispensable à la formation de l’autophagosome. Ces PI3P sont localisés et formés au niveau des régions spécifiques du réticulum endoplasmique (RE) ayant une forme de « Ω », et appelées « omégosomes ». L’omégosome constitue une plateforme indispensable au recrutement de la machinerie de l’autophagie (Axe et al., 2008; Roberts and Ktistakis, 2013).

Les phosphatidylinositols sont des phospholipides membranaires pouvant être phosphorylés, chez l'homme en position 3, par des protéines kinase classe III : PI(3)K III. La molécule résultante, la PI(3)P, est normalement inexistante dans la membrane du réticulum endoplasmique, lieu du recrutement des protéines impliqués dans l'initiation de la formation de l'autophagosome.

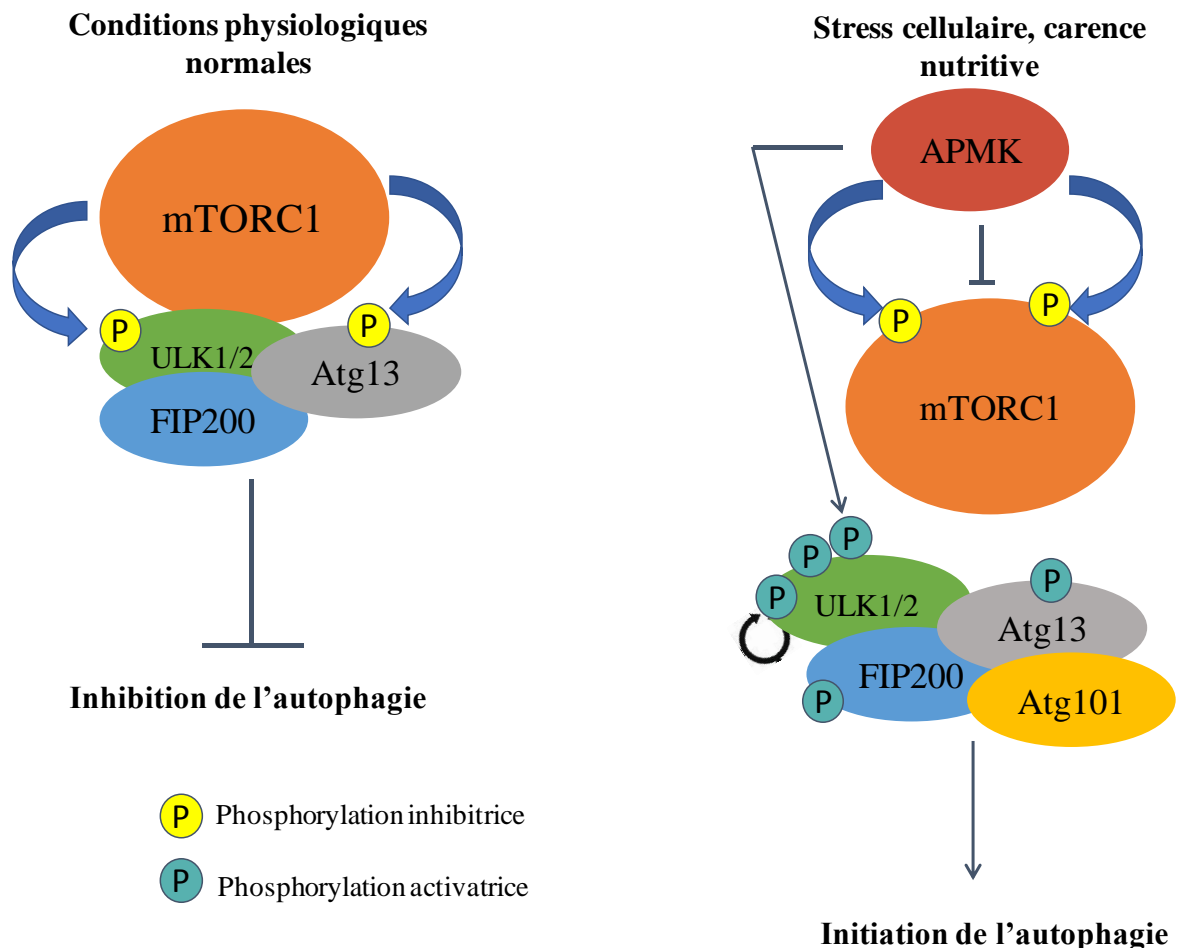


Figure 18 : Régulation de l'initiation du processus de l'autophagie.

Les complexes ULK1 et PI3KIII participent tous deux aux premières étapes de l'autophagie menant à la formation d'un organe à double membrane, appelé autophagosome, propre au processus de l'autophagie (Cianfanelli et al., 2015). La structure de la protéine est caractérisée par les domaines WD40 dans la région N-terminale. Les domaines WD40 sont très abondants chez les eucaryotes et peuvent participer à diverses fonctions cellulaires (notamment la transduction du signal, la division cellulaire et le traitement de l'ARN) en assurant la médiation des interactions protéine-protéine, protéine-peptide et protéine-ADN.

Dans les conditions physiologiques normales, Ambra1 est responsable de l'attachement du complexe Beclin1-PI3KIII au complexe moteur dynéine, grâce à son interaction avec DLC1/2 (Dynein light chain 1/2). Cet attachement régule négativement l'autophagie et bloque la re-localisation du complexe Beclin1-PI3KIII au niveau du RE ou les PI3P sont formées initiant la formation par la suite de l'autophagosome.

Une fois phosphorylé, le complexe ULK1 phosphoryle une protéine associée aux microtubules Ambra1 qui suite à cette phosphorylation se dissocie de DLC1 et participe ainsi à la translocation du complexe hVPS34-p150- Beclin-1 au niveau du RE (Di Bartolomeo et al., 2010; Fimia et al., 2007). La protéine mAtg14 localisée au niveau du RE recrute le complexe hVPS34-p150-Beclin-1 pour permettre la production de PI(3)P (Matsunaga et al., 2010).

Cette phosphorylation va permettre le recrutement d'Ambra1-Beclin1 (Di Bartolomeo et al., 2010) et hVPS34-p150 au niveau du RE, et ainsi la synthèse de PI3P au niveau du RE. La synthèse de PI3P va permettre le recrutement d'autres protéines nécessaires à la formation de l'omégasome (DFCP1) et au recrutement d'autres protéines Atg indispensable à la formation de l'autophagosome (WIPI1/2).

b. L'élongation

Après sa formation, le phagophore subit un phénomène d'élongation aboutissant à la formation d'un autophagosome à double membrane, entourant une partie du cytoplasme et incluant le substrat cellulaire spécifique à séquestrer. Cette étape est régulée par deux systèmes de conjugaison interdépendants nommés « Ubiquitin-like conjugaison système » imitant le même rôle que le système d'ubiquitination des protéines et formés par trois classes de protéines : les enzymes activatrices E1, les enzymes de conjugaisons E2, et les ubiquitines ligase E3. Le premier système est le système Ag12-Atg5, se situant sur la membrane externe du phagophore en élongation et qui se dissocie dès la fermeture de l'autophagosome, et le système LC3-PE ou LC3-II, qui se distribue d'une manière équitable entre les membranes externe et interne de l'autophagosome. Au contraire du premier système, ce système ne se dissocie pas après fermeture de l'autophagosome, ce qui en fait un marqueur idéal pour l'étude de l'autophagie (Klionsky, 2009).

c. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome

L'étape de fusion de l'autophagosome avec des endosomes aboutit à la formation des amphisomes, qui, par la suite, fusionnent avec les lysosomes où le contenu cytoplasmique des amphisomes est dégradé grâce aux hydrolases acides des lysosomes tels que les lipases, les protéases et les nucléases. L'ensemble des produits de dégradation sera libéré dans le cytosol grâce à des transporteurs lysosomiaux et sera réutilisé par la cellule dans des réactions anaboliques (Ryter and Choi, 2015; Teter et al., 2001).

L'autophagosome et le lysosome doivent être très proches avant même que la fusion ait lieu. En première étape, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec la membrane du lysosome. Une fusion complète nécessite la dégradation de la membrane interne par les hydrolysosomes et l'exposition du contenu de l'autophagosome dans la lumière du lysosome. Durant cette étape, de nombreuses protéines interviennent telles que les protéines du cytosquelette, et des protéines spécifiques tels que les SNARE.

9.3.2. Interaction entre les voies AhR-Nrf2 et autophagie

Le stress oxydant induit par les PM_{2.5} est considéré comme un mécanisme moléculaire important pour la médiation des effets toxiques des particules. Ce stress est caractérisé par une perturbation de la balance entre la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et des antioxydants de défense (Brigelius-Flohé and Flohé, 2011).

Une production excessive d'ERO, et surtout de radicaux libres, cause un dommage à l'ADN, l'ARN et même aux protéines et lipides cellulaires, d'où la possibilité de dégradation par le mécanisme d'autophagie, permettant de maintenir le fonctionnement cellulaire.

Un lien entre l'autophagie et la voie de défense enzymatique contre le stress oxydant a été mis en évidence, conférant au processus de l'autophagie un rôle cytoprotecteur. L'activation de l'autophagie est donc un élément clé de la réponse cellulaire au stress oxydant, car le processus élimine les composants défectueux avant que d'autres dommages / agrégations ne se produisent. En résumé, l'interaction et l'équilibre entre les ERO et l'autophagie peuvent être un élément clé de la régulation de l'homéostasie cellulaire (Fang et al., 2017). Cette interaction implique l'intervention de la protéine P62/sequestrome (SQSTM1) connue comme protéine adaptatrice de l'autophagie, responsable de la formation des agrégats de protéines destinées à la dégradation par autophagie. L'interaction entre ces deux voies de signalisation se traduit par une interaction entre P62 au niveau de son domaine

KIR (Keap1interacting region) et Keap1 au niveau de son domaine Kelch repeat domaine. Cette interaction va permettre la dissociation de ce dernier du facteur Nrf2, en inhibant la liaison de Kelch repeat domaine, au domaine Neh2 de NRF2 (**Figure 19**).

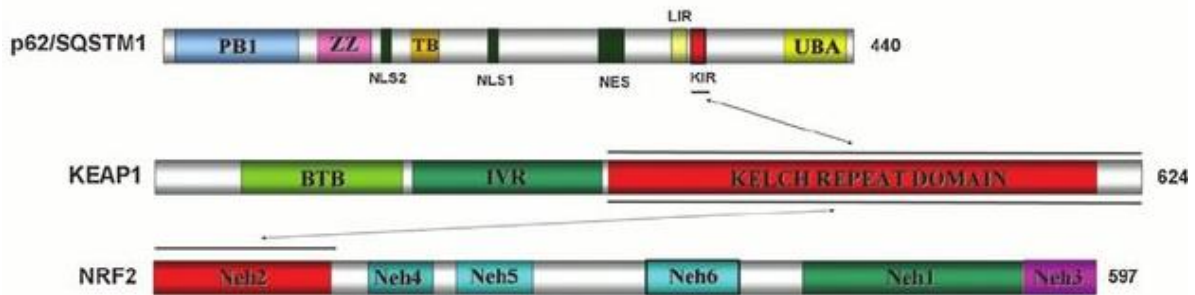


Figure 19 : Représentation schématique des domaines structurales et fonctionnels des protéines P62, KEAP-1 et NRF2. NRF2 est composée de six domaines nommés Neh1 à Neh6. Le domaine Neh2 est responsable de la liaison à Keap-1 au niveau de son domaine répété Kelch. Ce même domaine permet la liaison de KEAP-1 et P62 au niveau de son domaine KIR. A son tour, le domaine LIR de P62 va permettre sa liaison à LC3-b.

Ainsi, dans des conditions normales, à un niveau basal, l'autophagie dégrade continuellement p62. Cependant, dans des conditions de stress oxydant, un déficit en autophagie se produit et p62 s'accumule dans le cytoplasme. Il interagit avec Keap-1, perturbant la dégradation de Nrf2 et permettant, par conséquent, la transcription de gènes ciblés par Nrf2. La régulation transcriptionnelle de p62 par Nrf2 crée par la suite une boucle de rétroaction positive (Navarro-Yepes et al., 2014; Oberdörster et al., 2005) (**Figure 20**).

9.3.3. PM_{2.5} et apoptose et autophagie

Le stress oxydant est considéré comme un important mécanisme moléculaire intervenant dans la toxicité des PM_{2.5}. La production excessive des ERO peut générer des dommages sur des macromolécules de la cellule. Le maintien du bon fonctionnement cellulaire nécessite la dégradation de ces macromolécules endommagées et l'autophagie peut remplir ce rôle. La dégradation est assurée par la formation d'une vésicule double membrane appelée autophagosome (Abounit et al., 2012; Chen et al., 2008). La formation de cette double membrane implique l'intervention de plusieurs protéines telles que l'ATG5, Beclin-1 et LC3-B. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression des gènes correspondant suite à l'exposition aux particules atmosphériques (Deng et al., 2013a; Liu et al., 2015).

Ces protéines peuvent être dégradées, lors de l'induction de l'apoptose, provoquant ainsi l'atténuation de l'élimination des macromolécules endommagées (Martin et al., 2016 ;

You et al., 2013). La mise en évidence de l'apoptose peut se faire par l'étude des caspases. Ainsi, il pourra être intéressant d'évaluer l'expression des protéines ATG5, LC3-B, Beclin-1 et P62 (autophagie), et des caspases 7 et 8 (apoptose) afin de mettre éventuellement en évidence l'induction de ces deux mécanismes sur des cellules BEAS-2B exposées aux particules atmosphériques.

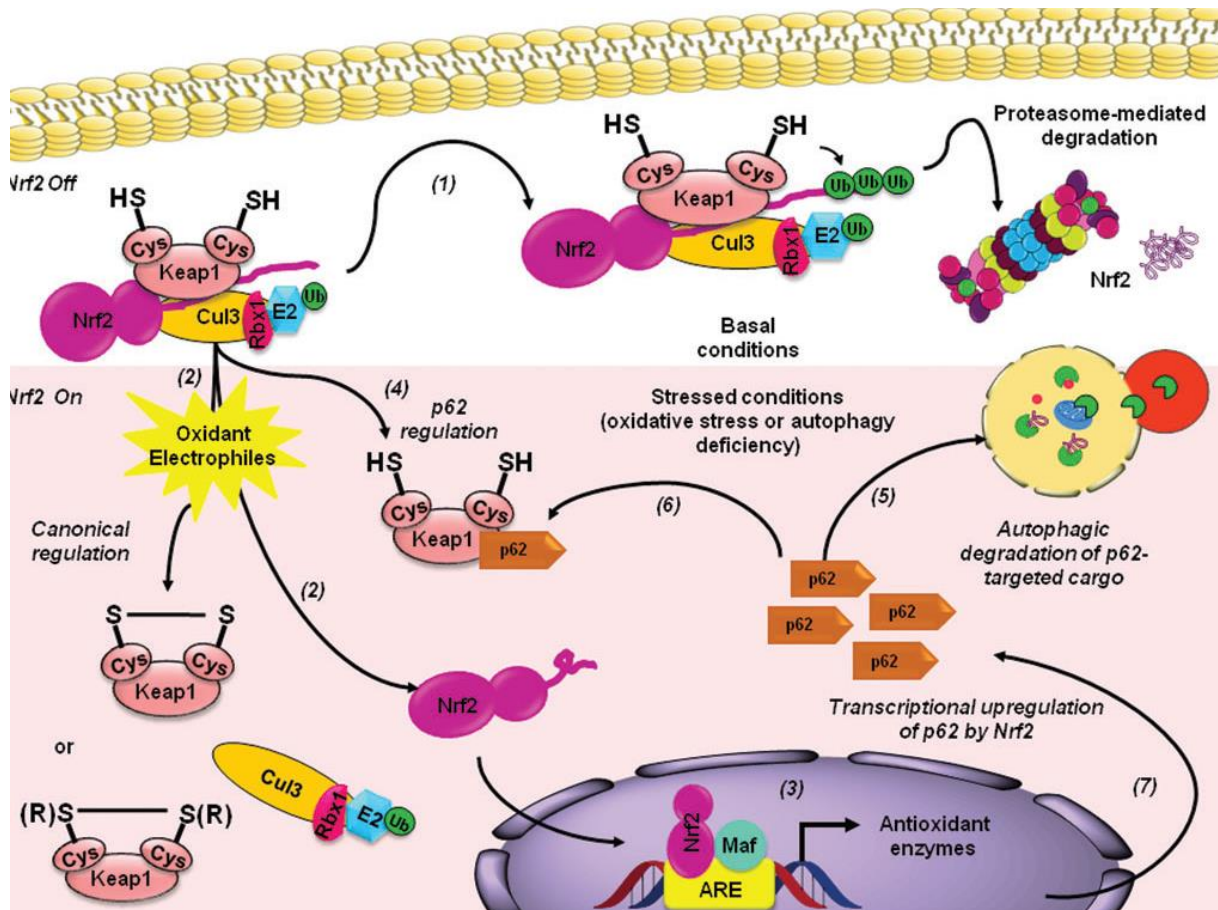


Figure 20 : Interaction entre les deux voies : Nrf2 et autophagie (Navarro-Yepes et al., 2014). Keap-1 est un régulateur de la voie de signalisation Nrf2-dépendante. (1) dans les conditions physiologiques normales, Nrf2 est bloquée dans le cytoplasme par Keap-1 et est continuellement dégradée. (2) Dans des conditions de stress oxydatif, Nrf2 est libérée de Keap-1 et migre dans le noyau (3) où elle induit l'expression des gènes impliqués dans la défense anti-oxydante. (4) P62 permet aussi l'activation de la voie Nrf2, via la dégradation autophagique de Keap-1. Cependant, (5) dans les conditions physiologiques normales, P62 est continuellement dégradée par voie autophagique. Par contre, en cas de stress oxydant (6), P62 s'accumule dans le cytoplasme et interagit avec Keap-1 permettant sa dégradation. De plus, (7) Nrf2 induit l'expression de P62, ce qui va permettre de créer un rétrocontrôle positif entre ces deux protéines.

Problématique de Recherche



Problématique de recherche

La pollution de l'air, pourtant sensiblement réduite par rapport aux situations qui prévalaient il y a quelques décennies, aussi bien dans l'air extérieur, que dans les espaces intérieurs où l'homme passe le plus clair de son temps, continue aujourd'hui à exercer des effets néfastes sur la santé de chacun. De nos jours, la pollution par les particules représente un réel enjeu de santé publique. La granulométrie des particules conditionne leur degré de pénétration et de rétention dans les poumons. Les particules fines atmosphériques, communément appelées $PM_{2.5}$, c'est-à-dire ayant un diamètre aérodynamique inférieur à $2,5 \mu m$, peuvent pénétrer profondément dans le système respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires. Les particules ultrafines (ou $PM_{0.1}$), quant à elles, peuvent traverser la barrière alvéolo-sanguine et ainsi être diffusées vers les différents organes de l'organisme tels que le foie, le cœur et le cerveau.

La pollution atmosphérique particulaire constitue un véritable défi car elle représente une nature infiniment plus complexe que les polluants gazeux, que ce soit au niveau de ses sources, de ses mécanismes de formation et de sa composition. Les $PM_{2.5}$ constituent un mélange hétérogène et très complexe d'éléments inorganiques (*e.g.* métaux, métalloïdes et ions) sur lesquels peuvent s'adsorber des composés organiques (*e.g.* hydrocarbures aromatiques polycycliques, dioxines, furannes, et PCBs) ainsi qu'une fraction biologique (*e.g.* pollens, bactéries, spores fongiques).

A ce jour, beaucoup d'études ont évalué *in-vitro* la toxicité des PM dans leur état particulaire global. Par contre, aucune étude n'a répondu à la question de savoir, parmi les fractions constitutives des PM (organique *versus* inorganique) citées ci-dessus, laquelle est responsable des effets toxiques observés, ou contribue majoritairement à ces effets.

Les particules étudiées ont été prélevées au Liban, pays en développement du Moyen-Orient, situé à l'est du bassin méditerranéen et confronté à de sévères problèmes de pollution. Beyrouth, la capitale, est une ville urbaine très dense, caractérisée par une densité de transport élevée. Ce secteur est l'une des principales causes de la pollution atmosphérique au Liban, en raison de l'absence de transport public organisé et de la présence d'un grand nombre de véhicules particuliers vétustes et mal entretenus, principalement à motorisation essence. Par ailleurs, Beyrouth souffre également d'un problème majeur de fourniture

d'électricité par le secteur public. Ce manque en électricité est comblé, dans les secteurs industriels et résidentiels, par l'utilisation de générateurs électriques privés alimentés en carburant de type diesel, contribuant à dégrader davantage la qualité de l'air. De plus, entre les années 2015 et 2017, un problème d'incinération sauvage des déchets ménagers en plein air s'est répandu, non seulement à Beyrouth mais sur tout le territoire libanais.

Cette étude permettra, dans un premier temps, d'apporter des informations sur la composition chimique des particules fines et quasi ultrafines prélevées dans l'agglomération de Beyrouth, dans un quartier fortement influencé par le trafic automobile. Une des questions récurrentes liées à la problématique de l'impact sur la santé des particules atmosphériques est de comprendre leur mécanisme d'action, et de déterminer ce qui, au sein de la particule, est le plus impliqué dans la réponse toxique. Nous abordons ce problème par une approche originale, permettant de distinguer les effets de différentes fractions (granulométriques, extractibles ou non) des $PM_{2.5}$ en essayant de les relier à leurs caractéristiques chimiques.

Ainsi dans ce travail, nous étudierons :

- **la différence en termes de composition et de toxicité entre particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et particules quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$).**
- **les effets toxiques des fractions organique extractible et non extractible des $PM_{2.5-0.3}$ en comparaison aux $PM_{2.5-0.3}$ considérées dans leur entièreté.**

Dans ce cadre, une étude préliminaire a été menée à Beyrouth, sur des $PM_{2.5}$ échantillonnées à proximité de l'avenue de l'aéroport de Beyrouth. Cette étude visait à évaluer, *in vitro*, l'effet toxique de l'extrait organique des $PM_{2.5}$ sur des cellules épithéliales bronchiques humaines, la lignée BEAS-2B et à sélectionner des paramètres dans le cadre de l'étude des effets des différentes fractions de la particule.

Dans un second temps, une étude plus approfondie a été menée sur des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) échantillonnées sur le même site. En plus des $PM_{2.5-0.3}$, un extrait contenant la fraction organique des $PM_{2.5-0.3}$ ($EOM_{2.5-0.3}$), et les particules restantes, considérées dans notre étude comme la fraction non extractible (par un solvant organique) des PM ($NEM_{2.5-0.3}$) ont été considérées.

D'autre part, nous avons comparé la toxicité de deux extraits organiques de particules fines $PM_{2.5-0.3}$ ($EOM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines $PM_{0.3}$ ($EOM_{0.3}$), tout en essayant de relier nos observations à leur différence de composition.

La cytotoxicité globale des différentes fractions considérées a tout d'abord été déterminée, puis leur capacité à induire l'expression de différents gènes impliqués dans la métabolisation des composés organiques. En considérant 2 doses bien définies, nous avons ensuite évalué la capacité des particules et de leurs différentes fractions à générer une génotoxicité, un stress oxydant et une réponse inflammatoire. Nous avons enfin étudié l'induction des mécanismes d'apoptose et d'autophagie qui, comme nous l'avons évoqué peuvent être reliés au stress oxydant. La problématique de la recherche et les différents mécanismes de toxicité étudiés sont présentés respectivement sur la **Figure 21** et la **Figure 22**.

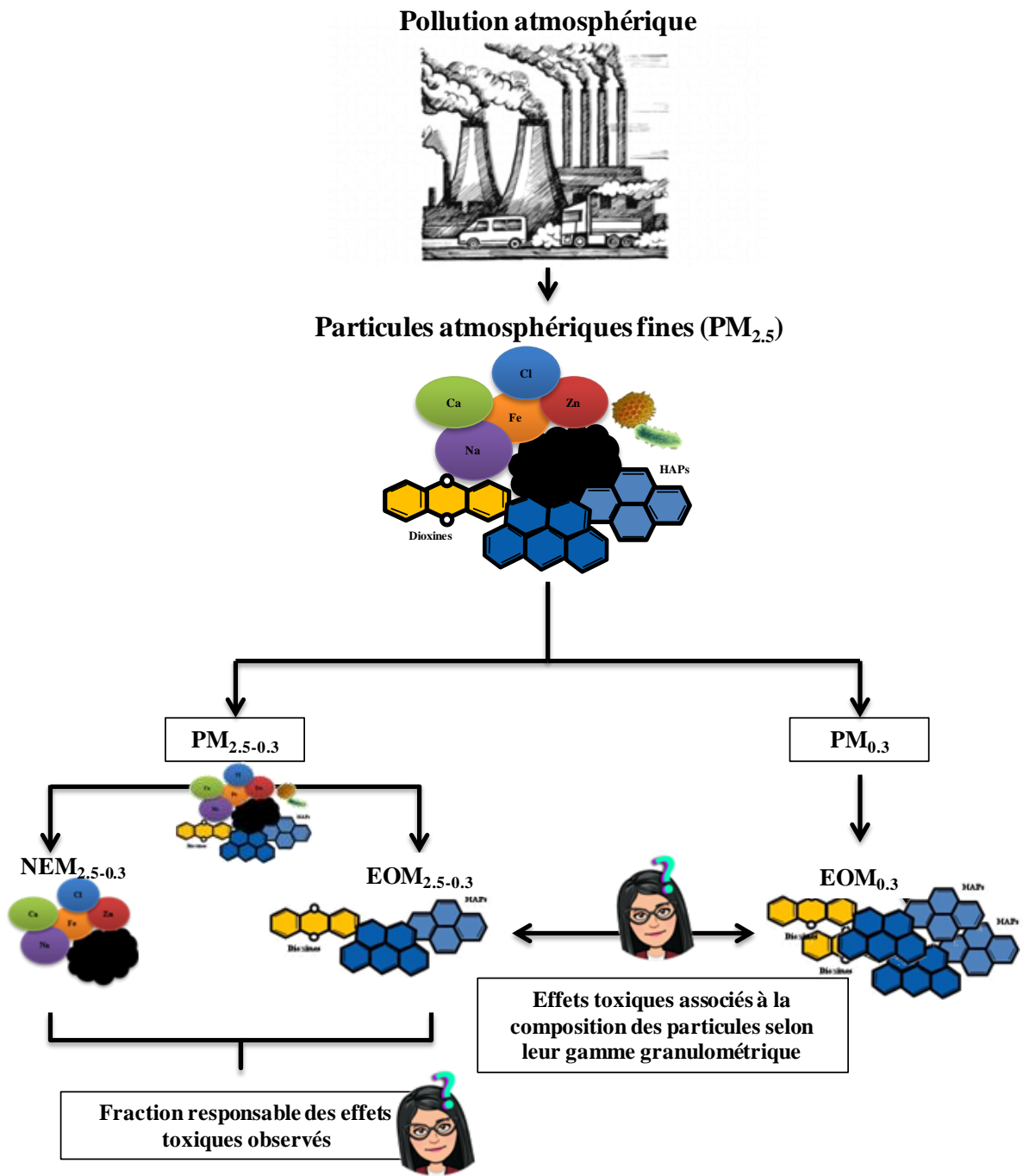


Figure 21 : Problématique générale de recherche

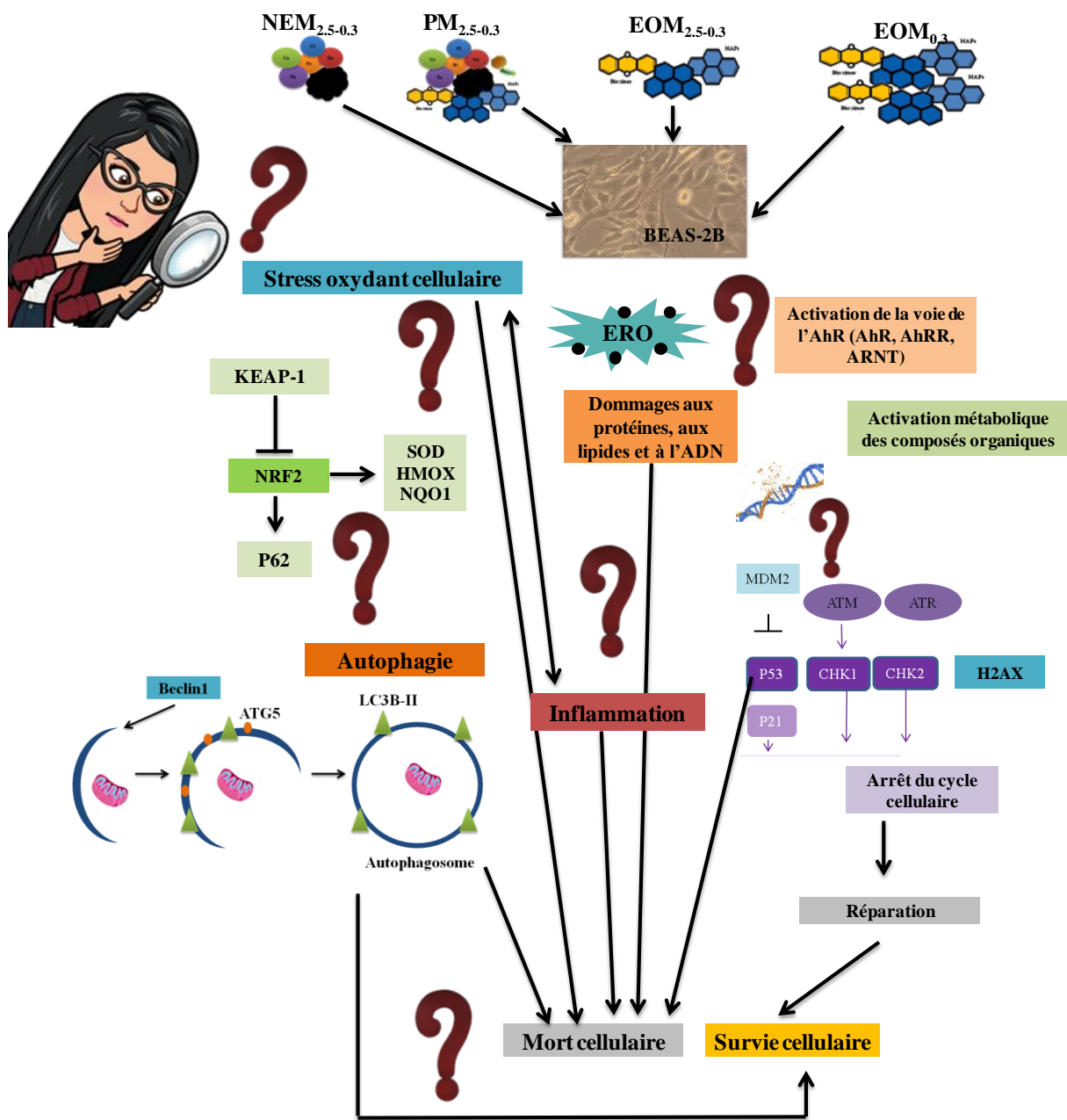


Figure 22 : Mécanismes de toxicité des particules atmosphériques évalués au cours de ce travail

Chapitre II : Matériels & Méthodes

plus, le problème de la gestion des déchets dans le pays a vu également naître des foyers d'incinération non civilisée des déchets ménagers, contribuant à la dégradation de la qualité de l'air (Baalbaki et al., 2016).

A partir des données climatologiques (température, humidité, direction et vitesse de vent) relevées au niveau de l'aéroport de Beyrouth (source *www.infoclimat.fr*), nous avons tracé la rose des vents (**Figure 24**) sur la période d'échantillonnage, en utilisant le logiciel libre R et le package *openair* (Carslaw and Ropkins, 2012). Les vents les plus fréquents, sont issus d'Est et du Sud-est, pointant vers l'intérieur des terres et les zones les plus urbanisées de la banlieue sud. Ces directions de vent majoritaires sont associées à des vitesses de vent faibles ou très faibles (inférieures à 4 m/s). Ceci rend compte de conditions particulièrement défavorables à la dispersion des polluants. L'absence de vents de vitesse élevée durant la période d'échantillonnage peut favoriser l'accumulation des polluants dans cette région.

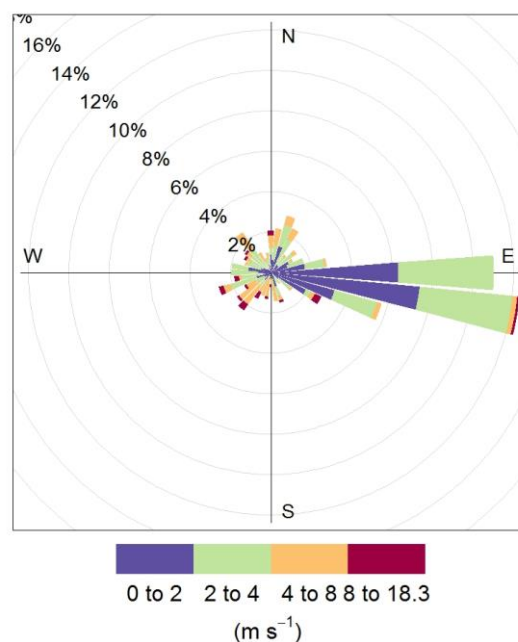


Figure 24 : Rose des vents à Beyrouth durant la période d'échantillonnage (données de l'aéroport de Beyrouth - *www.infoclimat.fr*).

2. Echantillonnage

L'échantillonnage des particules atmosphériques fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) a été réalisé entre le 3 Janvier et le 8 Mars 2017, sur des périodes de 5 jours, à l'aide d'un impacteur en cascade fonctionnant à haut débit : TISCH[®], modèle 235, fonctionnant à un

débit de 68 m³/h. L'impacteur a été placé sur le toit de la Commission Libanaise pour l'Energie Atomique (CLEA), à une hauteur de 12 m afin de limiter l'influence de la resuspension directe des particules du sol.

2.1. Principe de l'impaction

L'impacteur en cascade permet l'échantillonnage des particules, selon leur diamètre aérodynamique équivalent (DAE). L'impacteur utilisé est doté de 5 plaques métalliques, suivies d'un filtre d'arrêt (back-up) permettant la collecte des particules non retenues sur les étages supérieurs.

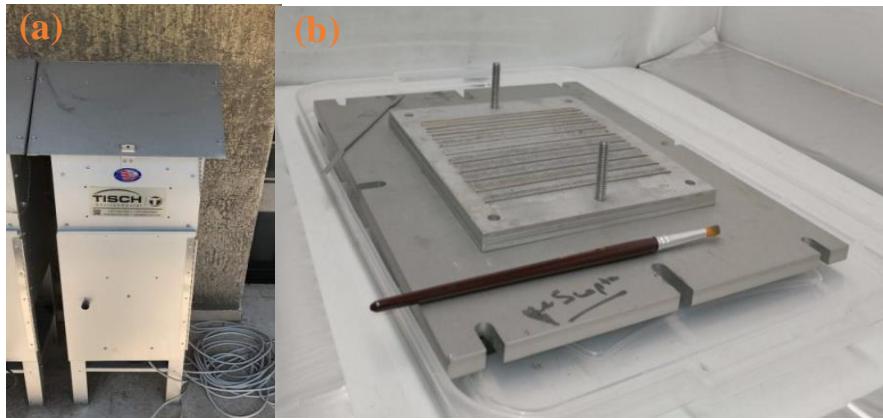


Figure 25 : Impacteur en cascade TISCH[®] 235 (a) et les 5 plaques métalliques d'impaction (b).

Les plaques métalliques possèdent des fentes calibrées de taille décroissante permettant la séparation des PM selon leur DAE. Le flux d'air est aspiré à un débit constant de 68 m³/h. Lors du passage successif du flux d'air à travers les fentes de taille décroissante, la vitesse du flux d'air croît d'un étage à l'autre. Sur chacun des étages, les particules ayant acquis une quantité de mouvement suffisante sortent du flux et viennent s'impacter sur les plaques. Cette technique permet ainsi de recueillir les particules les plus grosses sur les étages supérieurs et les plus fines sur les étages inférieurs. Les particules non impactées sont ensuite recueillies sur un filtre placé en série avec les plaques d'impaction.

La calibration des impacteurs se fait en termes de diamètre de coupure $D_{p,50}$, qui correspond à la taille (DAE) minimale des particules collectées sur un étage avec 50% d'efficacité. Pour un débit de 68 m³/h et pour une densité de 1 g/cm³, les valeurs de $D_{p,50}$ sont reportées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Diamètres de coupure des différents étages de l'impacteur TISCH modèle 235 ; 68m³/h (masse volumique des particules 1g/cm³).

Etage	1	2	3	4	5
D _{p,50} (µm)	5,08	2,10	1,04	0,66	0,33

Les PM ayant un DAE supérieur à 5,08 µm sont retenues sur un substrat de collecte placé sur la première plaque (filtre fendu), et ne seront pas considérées dans cette étude, alors que les PM ayant un DAE compris entre 5,08 et 0,33 µm passent dans le système et s'impactent successivement sur les plaques. Enfin, les particules quasi-ultrafines (DAE < 0,33µm) sont retenues sur le filtre d'arrêt (back-up), qui est constitué de fibres de quartz sans liant (Type Pall QAT-UP 2500).

L'analyse de la granulométrie des particules a montré que 98% des PM échantillonnées ont un diamètre compris entre 2,5 et 0,3 µm. Par la suite, ces PM seront dénommées PM_{2.5-0.3}.

2.2. Protocole de prélèvement

Avant chaque prélèvement, les plaques d'impaction en aluminium anodisé ont été lavées au détergent de laboratoire, rincées à l'eau déminéralisée puis à l'eau ultra-pure et mises à sécher sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire. Quant aux filtres d'arrêt, ils ont été préalablement enveloppés dans du papier aluminium puis traités à haute température dans un four à moufle à 450°C (Kfoury, 2013 ; Borgie et al., 2015) pendant 4 h, ceci afin d'éliminer les impuretés organiques susceptibles d'être présentes.

L'impacteur a été mis en place le lundi matin jusqu'au vendredi pour l'échantillonnage. Il est ensuite ramené au laboratoire puis les plaques sur lesquelles sont impactées les particules sont mises à sécher durant 48h. Les particules déposées sur les différentes plaques sont ensuite récupérées à l'aide d'un pinceau. Les PM_{2.5-0.3} récupérées sont ensuite placées dans un tube en verre et conservées à -20°C. Quant aux filtres retenant les particules quasi-ultrafines, ils ont été, après séchage, enveloppés dans du papier aluminium, puis conservés à -20°C, jusqu'à leur utilisation. Le **Tableau 5** montre les masses totales des PM_{2.5-0.3} et de PM_{0.3} recueillies sur la période d'échantillonnage. A la fin de la période d'échantillonnage, l'ensemble des PM_{2.5-0.3} échantillonnées ont été regroupées et le mélange a été homogénéisé sous agitation magnétique en présence d'un barreau aimanté et 2 billes en

téflon. L'échantillon moyen obtenu a été utilisé pour les différentes analyses physico-chimiques et la mesure des différents paramètres de toxicité.

De la même manière, nous avons considéré un échantillon moyen de $PM_{0.3}$. Ces dernières étant échantillonnées sur des filtres, nous avons utilisé des surfaces égales de chacun des filtres afin de former un échantillon moyen pour les analyses et la préparation des échantillons (extrait) destinés aux études de toxicité (Figure 26).



Figure 26 : Échantillons obtenus à la fin du prélèvement : $PM_{2.5-0.3}$ à gauche, et $PM_{0.3}$ sur filtre à droite.

Tableau 5 : Masse de particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et de particules quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) collectées à Beyrouth, durant la période d'échantillonnage (03-01-17 au 08-03-17).

	$PM_{2.5-0.3}$	$PM_{0.3}$
Masse collectée (mg)	976	1602

Partie B : Caractérisation physico-chimique des $PM_{2.5-0.3}$ et $PM_{0.3}$

Après échantillonnage, les particules fines et quasi-ultrafines ont été caractérisées, notamment en termes de composition en espèces inorganiques et organiques, afin de retirer une information sur leur origine. Les différentes méthodes utilisées sont décrites ci-après.

1. Dosage élémentaire par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES)

La composition des particules en éléments traces et majeurs a été réalisée par ICP-AES (inductively coupled plasma- Atomic emission Spectrometry). Nous nous sommes intéressés aux éléments suivants : As, Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, K, S, Sr, Sn, Ti, V, Zn. et, dont certains sont connus pour leur toxicité sur l'homme.

- Principe :

L'analyse des éléments par ICP-AES, repose sur le principe d'émission atomique. L'échantillon sous forme liquide est introduit dans un plasma d'argon (7000K) permettant d'atomiser et d'exciter les éléments constitutifs de l'échantillon. Ces atomes se désexcitent en émettant des raies de longueurs d'ondes caractéristiques de chaque atome et dont l'intensité est proportionnelle à la concentration.

- Mode opératoire :

Les particules subissent une minéralisation acide avant l'analyse de manière à faire passer les éléments constitutifs en solution. Environ 2 mg de $PM_{2.5-0.3}$ et 100-150 mg d'un mélange proportionnel de portions de filtres de $PM_{0.3}$ collectés durant les différentes sous-périodes, placés dans un vial en téflon en présence de 5,5 mL d'un mélange de trois acides $HNO_3/HF/HClO_4$ dans les proportions 4:1:0,5 (v/v), sont mis à chauffer pendant 4h à 120°C. Après minéralisation totale, la température est augmentée jusqu'à 170°C, afin de permettre l'évaporation des acides jusqu'à obtention d'une seule gouttelette. Le résidu est repris dans quelques mL d'eau ultrapure à 80°C. La solution obtenue est refroidie et ajustée à un volume de 13 ml et acidifiée à 0.2% (HNO_3), comme préconisé pour l'analyse (Ledoux et al., 2006). Cette solution est ensuite filtrée sur une membrane d'acétate de cellulose (0,45 μ m) avant d'être analysée.

L'appareil (ICP-AES, iCAP 6000 series, ThermoElectron, UK) est calibré à partir d'une gamme d'étalons multi-élémentaires pour pouvoir déterminer la concentration des éléments présents dans les échantillons analysés. Les raies choisies, la gamme d'étalonnage retenue et les limites de quantification (LDQ) de chaque élément figurent dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Caractéristiques de la méthode de dosage des éléments par ICP-AES.

Eléments	Longueur d'onde (nm)	Gamme d'étalonnage (ppb)	Limites de quantification (ppb)
Al	396,1	50-20000	4
As	189,0	5-2000	8
Ba	455,4	0,5-50	0,4
Ca	315,8	50-20000	20
Cd	214,4 ; 266,5 ; 228,8	5-2000	3
Cu	324,7	10-500	8
Co	228,6	5-2000	4
Cr	267,7 ; 283,5	5-2000	5
Fe	238,2	50-20000	20
Mg	279,5 ; 280,2	50-20000	15
Mn	260,5 ; 257,6	5-500	1
Mo	202 ; 204,5	5 -2000	4
Na	588,9	8-3300	40
Ni	231,6	5-2000	4
P	178,2	5-2000	3
Pb	220,3	5-2000	3
K	766,4 ; 769,8	50-200000	25
Sn	189,9		3
Sr	407,7	0,5-50	0,2
Ti	323,4	5-500	4
V	292,4	5-2000	3
Zn	213,8	5-500	2

2. Dosage des ions hydrosolubles par chromatographie ionique

- Principe :

La chromatographie par échange d'ions, sépare les molécules selon leurs charges. Les ions de l'analyte (présents dans la phase mobile), subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire contenant des groupes fonctionnels chargés, ce qui entraîne leur rétention.

- Mode Opérateur :

Environ 2 mg de particules fines et 100 mg de filtre, sont utilisés pour l'extraction des espèces. 2 à 3 mL d'eau ultrapure sont ajoutés aux échantillons, suivi d'un traitement aux ultrasons pendant 20 min, à 20°C. Après sonication, la solution obtenue est centrifugée à 400g, 20°C, pendant 10 min. De cette solution, le surnageant est récupéré, alors que les particules (ou filtre) présentes dans le culot, subissent le même traitement 2 autres fois successivement, afin de maximiser l'extraction. Les espèces NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- et NH_4^+ sont analysées et quantifiées dans la solution finale par chromatographie ionique (IC, model ICS 5000, ThermoElectron, UK).

3. Microanalyse élémentaire CHNS-O

- Principe :

La microanalyse élémentaire permet de déterminer les teneurs en éléments, tels que le carbone, l'hydrogène, l'azote, le soufre et l'oxygène, contenus dans l'échantillon particulaire, suivant des réactions d'oxydation ou de réduction de ces éléments détectés ensuite sous forme de gaz, CO_2 , H_2O , N_2 , SO_2 et CO analysé par chromatographie gazeuse.

Analyse CHNS :

L'échantillon est enrobé dans une capsule d'étain (pour les échantillons sous forme de poudre) ou feuille d'étain (pour les filtres) puis introduit dans une colonne portée à 950°C, sous flux contrôlé d'hélium et de dioxygène. L'oxydation de l'étain, très exothermique, fait alors monter la température à 1800°C permettant l'atomisation des éléments d'intérêt. Cette réaction est suivie d'une oxydation/réduction catalytique des composés obtenus en N_2 , CO_2 , H_2O et SO_2 , et de l'élimination de l'excès d'oxygène introduit sur du cuivre métallique.

Analyse O :

L'analyse micro-élémentaire de l'oxygène est assurée par la pyrolyse de l'échantillon, enveloppé dans une capsule en argent, à 1000°C sous flux d'hélium, sans aucune injection d'oxygène, suivie d'une conversion de l'oxygène obtenu en CO.

Dans les deux cas, les fours sont liés à une GC-TCD, permettant la séparation et la détection des composés à partir de leur conductivité thermique. La quantité de chaque élément présent dans l'échantillon est déterminée après étalonnage (analyse de différentes masses de composés de composition connue).

- Mode opératoire :

La quantification CHNS-O a été réalisée à l'aide de l'analyseur "Flash2000, ThermoFisher Scientific". Entre 0,5 et 2 mg de particules PM_{2.5-0.3} et environ 1 cm² de filtre contenant les PM_{0.3} ont été utilisés pour l'analyse.

4. Analyse par MEB-EDX

La microscopie électronique à balayage associée à une microanalyse X (MEB-EDX), est une technique permettant l'examen de la morphologie de la particule atmosphérique ainsi que la détermination de sa composition élémentaire.

- Principe :

Un faisceau électronique de quelques nanomètres de diamètre balaie la surface de l'échantillon. Lorsque les électrons viennent frapper l'échantillon, ils provoquent plusieurs phénomènes :

- l'échantillon émet lui-même des électrons secondaires.
- Une partie des électrons primaires est réfléchi (rétrodiffusion).
- les électrons sont absorbés par l'échantillon.
- l'échantillon émet des rayons X.

Tous ces phénomènes sont interdépendants de la topographie, du numéro atomique et de l'état chimique de l'échantillon. Les électrons secondaires sont ainsi exploités pour l'obtention d'images topographiques, tandis que les électrons rétrodiffusés permettent d'obtenir une image basée sur la différence de numéro atomique des éléments composant l'échantillon (image par contraste chimique). Les rayons X émis permettent, quant à eux, d'accéder à la composition chimique de l'échantillon.

- **Mode opératoire :**

Environ 1 mg de particules sont mis en suspension dans un solvant inerte (n-hexane) à l'aide d'un traitement aux ultrasons de 5 minutes. La solution est ensuite filtrée sur une membrane polycarbonate (Nucléopore, 0,22 μm). Cette dernière est ensuite fixée sur un plot en aluminium de 1 cm de diamètre à l'aide d'une pastille de carbone autocollante. L'échantillon est ensuite métallisé au carbone de manière à le rendre conducteur et est placé dans la chambre du microscope.

5. Etude des phases cristallines par la technique de Diffraction des Rayons X (DRX)

- **Principe :**

Cette technique a été utilisée pour identifier les phases cristallisées dans les particules fines. L'échantillon est irradié par un rayonnement X émis par une source fixe. Les cristaux diffractent les rayons X, un détecteur détecte les angles pour lesquels il y a un rayonnement diffracté et en mesure l'intensité.

- **Mode opératoire :**

Une fine couche de particules $\text{PM}_{2.5-0.3}$ est placée sur un support amorphe, en veillant que la surface de l'échantillon soit bien plane. Les analyses ont été réalisées sur un diffractomètre de rayons X (XRD AXS D8 Advance, Brüker, Germany) à une température ambiante pour un domaine 2θ allant de 10 à 80° avec un pas de mesure de 0,02° et un temps d'accumulation par pas de 10 s. Le diffractomètre est équipé d'une anticathode de cuivre ($\lambda_{\text{K}\alpha\text{Cu}} = 1,5406$ Angstroms). Le diffractogramme ainsi obtenu est interprété en le comparant avec ceux de solides de référence contenus dans la base de données JCPDS établie par le centre international des données de diffraction (ICDD).

6. Analyse de la fraction organique

6.1. Quantification des HAPs et des paraffines par GC-MS

- **Principe :**

La chromatographie phase gaz couplée à la spectrométrie de masse, GC-MS, est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse (GC), pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse (MS), pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport de masse (m) sur charge (z) (m/z). Après injection du mélange dans la GC, les différents composés sont

séparés dans une colonne spiralée contenant de la silice modifiée. En sortie de colonne, les composés sont détectés et identifiés par MS.

- **Mode opératoire :**

Afin de déterminer la composition organique en HAPs et paraffines, les particules sont soumises à une extraction aux ultrasons en présence de 10 mL de dichlorométhane. Cette extraction est répétée 4 fois afin d'assurer l'extraction de la totalité de la fraction organique extractible. Le même échantillon a été utilisé et pour l'analyse et pour les études de toxicité, et le protocole sera détaillé dans la partie **C.1** de ce chapitre.

La solution obtenue est ensuite filtrée avant d'être concentrée sous flux d'azote (N₂) et analysée par la GC-MS (GC-MS model 1200 TQ, Varian, USA).

6.2. Quantification des HAPs chlorés

Les HAPs chlorés incluent les dioxines, furanes et les "dioxin-like PCB ". Les analyses de ces composés ont été confiées à Micropolluants Technology SA (Saint-Julien-Les-Metz, France). Ce service d'analyse utilise les méthodes recommandées par l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency) 1613 et 1668 et la chromatographie phase gaz à haute résolution combinée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC/HRMS) (Borgie et al., 2016).

Pour les PM_{0,3} échantillonnées sur filtre, un morceau de chaque filtre est utilisé pour former un échantillon moyen de PM_{0,3}. L'ensemble des filtres est imbibé par 1 mL d'HCl (12N) et est mis à sécher une nuit. Des étalons internes EN-1948 ESC (BCP-instruments) sont rajoutés, et les filtres sont extraits au Soxhlet en présence de toluène pendant 24 heures. La solution obtenue est ensuite concentrée sous flux d'azote jusqu'à un volume de 20 mL. Cette solution est ensuite purifiée sur une colonne de silice et éluée avec de l'hexane. L'éluat obtenu est ensuite concentré à 20mL et purifié sur une colonne d'alumine : les PCB sont élués au toluène puis concentrés dans un volume de 100 µL, alors que les PCDDs et PCDFs sont élués avec un mélange dichlorométhane/hexane (60/40) puis concentrés à 10µL.

Pour les particules fines, 10 mg de PM ont été placées dans 4 mL d'HCl (1/10) sous agitation magnétique pendant deux heures, puis filtré sur filtre en fibre de verre (LPCR 125 mm, 0,7 µm). Après séchage, les étalons internes sont ajoutés et le filtre de rétention de PM est extrait par ASE (accelerated solvent extraction). La solution est purifiée identiquement à celle des PM_{0,3}.

Les concentrations en PCB et PCDD / F ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Agilent Technologies 7890A équipé d'une colonne capillaire DB 5MS (longueur 40 m, diamètre interne 0,18 mm, épaisseur du film 0,18 μm) couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (Autospec Premier, Waters)

6.3. Dosage des O et N- HAPs

La concentration de 8 O-HAP et de 15 N-HAP a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse - ionisation chimique négative - spectrométrie de masse (GC-NCI-MS). Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un système CPG 7890B couplé à un détecteur MS 7000D (Agilent Technologies, USA) avec une colonne capillaire DB-5MS-UI (Agilent Technologies). Le programme de température de la colonne était : 70°C pendant 2 minutes, puis a augmenté à 180°C (15°C/min), puis à 280°C (5°C/min) pour atteindre 325°C (15°C/min, maintenu 5min), qui donne une durée totale de 37,5 min. Le système MS a été utilisé en mode NCI avec du méthane 5.5, 0,5 mL.min⁻¹ et en utilisant une énergie d'ionisation de 135 eV. Les composés ont été identifiés et quantifiés en fonction de leur temps de rétention et en utilisant le mode de surveillance des ions (SIM).

Partie C : Evaluation de la toxicité des $PM_{2.5-0.3}$ et $PM_{0.3}$

1. Préparation des différents échantillons destinés à l'étude de toxicité

Les paramètres de toxicité ont été évalués sur les $PM_{2.5-0.3}$ dans leur intégralité, leur fraction extractible ($OEM_{2.5-0.3}$) et la fraction non extractible ($NEM_{2.5-0.3}$). Quant aux $PM_{0.3}$, ces dernières étant prélevées sur filtre, seule une évaluation des effets toxiques de leur extrait organique ($OEM_{0.3}$) a été réalisée.

La préparation des différentes fractions s'est appuyée sur des traitements aux ultrasons en utilisant le dichlorométhane (DCM) comme solvant d'extraction. Le processus d'extraction est résumé sur la

Figure 27. L'extraction aux ultrasons va permettre de récupérer non seulement l'extrait organique, mais aussi les PM débarrassées des composés organiques extraits après centrifugation. Cette dernière fraction représente la fraction non extractible des PM, a priori, majoritairement constituée de carbone inorganique, métaux, ions et métalloïdes.

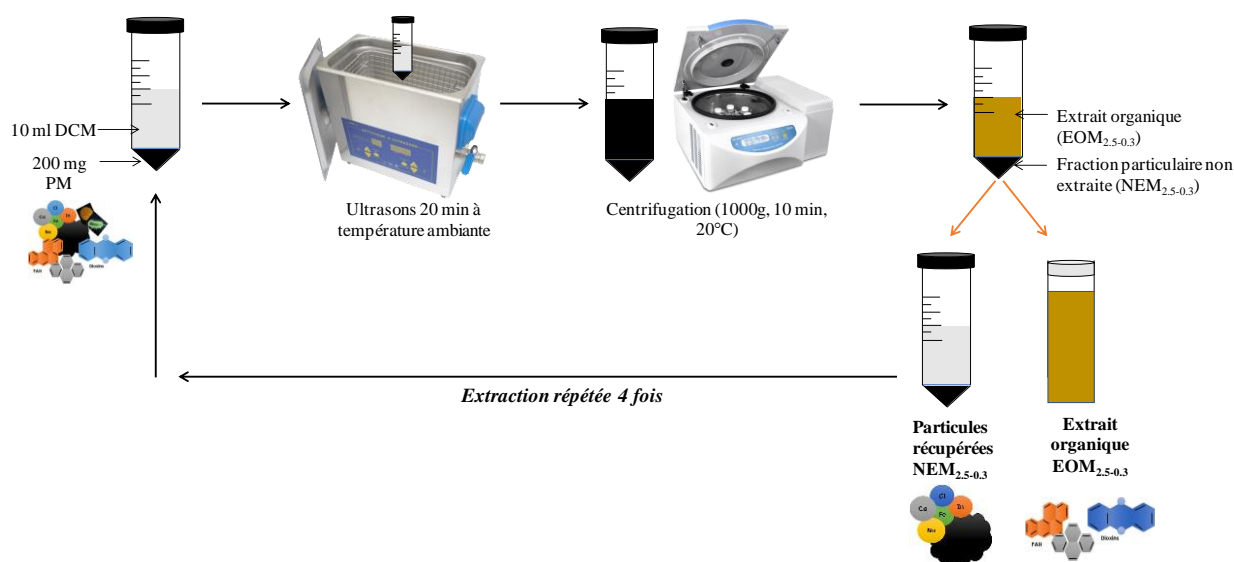


Figure 27 : Protocole d'extraction de la fraction organique des $PM_{2.5-0.3}$ ($EOM_{2.5-0.3}$), permettant aussi la récupération de la fraction non-extraite par le dichlorométhane ($NEM_{2.5-0.3}$).

Les $PM_{2.5-0.3}$ (200 mg) sont placées dans un tube à centrifuger en verre avec 10 mL de DCM et est soumis à un traitement ultrasons (10 min $20^{\circ}C$). Après extraction, le mélange est centrifugé (1000g, 10 min, $20^{\circ}C$), permettant la séparation de la partie organique extraite (se trouvant dans le surnageant), des PM débarrassées de cette fraction (formant un culot particulaire). Le surnageant est récupéré ensuite et cette extraction est répétée 4 fois successivement avec du DCM frais, afin d'assurer la récupération de la totalité des composés organiques extractibles.

Concernant les $PM_{0.3}$ collectées sur des filtres, il n'est pas possible de tester directement les particules les plus fines et, par conséquent, seul un extrait organique a été constitué à partir d'un mélange de portions de filtres représentatif et renfermant une masse de 200mg de particules. Le protocole d'extraction identique à celui des $PM_{2.5-0.3}$. Cette méthode d'extraction a été validée par l'extraction d'un échantillon de particules PM_{10} -like dont les teneurs sont certifiées en HAP (ERM CZ100), par la méthode proposée, et deux méthodes couramment utilisées telles que l'extraction Soxhlet et l'ASE. Les résultats obtenus par les 3 méthodes étaient comparables et les écarts de concentrations par rapport aux valeurs certifiées étaient acceptables dans la mesure où ceux-ci n'excédaient pas 15%. Finalement, pour chacun des échantillons, les solutions résultant des extractions successives des PM par le DCM ont été rassemblées, et le DCM a été évaporé sous flux d'azote et remplacé par du diméthylsulfoxyde (DMSO), compatible avec les études de toxicité, comme déjà publié par ailleurs ([Borgie et al., 2015](#)).

Pour résumer, deux extraits organiques de $PM_{2.5-0.3}$ ($OEM_{2.5-0.3}$) et de $PM_{0.3}$ ($OEM_{0.3}$) dans du DMSO ont été obtenus, ainsi que la matière non extractible de $PM_{2.5-0.3}$ ($NEM_{2.5-0.3}$).

Les concentrations finales des extraits ont été exprimées en mg PM-équivalent/mL (mg PM-éq/mL) qui sont en lien avec la masse de particules considérées pour l'extraction et le volume de DMSO final. Celles-ci étaient respectivement de 98,08 et 96,41 mg PM-éq/mL pour $OEM_{2.5-0.3}$ et $OEM_{0.3}$. Ces solutions ont été utilisées pour préparer les solutions d'exposition des cellules aux différentes doses. Pour cela, un volume d'extrait a été ajouté au milieu de culture. Dans tous les cas, la concentration finale en DMSO n'excédait pas 0,5%, valeur en deçà du seuil auquel une toxicité peut être observée. Les concentrations d'exposition sont exprimées en μg PM-éq/cm², en lien avec la dose et la surface de la boîte de culture dans laquelle les cellules sont exposées.

2. Evaluation des effets toxiques des échantillons préparés

L'étude des effets toxiques des $PM_{2.5-0.3}$ dans leur entièreté, de leur fraction organique extractible ($EOM_{2.5-0.3}$) ainsi qu'e de leur fraction non extractible par le DCM ($NEM_{2.5-0.3}$) a été réalisée sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). D'autre part, les cellules ont également été exposées à l'extrait organique des $PM_{0.3}$ ($EOM_{0.3}$). Nous avons évalué la capacité de ces différents échantillons à induire une cytotoxicité, à déclencher un stress oxydant, à activer les voies de métabolisation des composés organiques, de génotoxicité et de dommages à l'ADN. Enfin, nous nous sommes également intéressés au déclenchement des mécanismes d'apoptose et d'autophagie sous l'effet de l'exposition aux $PM_{2.5-0.3}$.

2.1. Matériel biologique

L'évaluation des effets toxiques des particules atmosphériques, ainsi que de leurs différentes fractions, a été réalisée sur une des cellules BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™, ECACC, Wiltshire, UK). Cette lignée cellulaire, dérivée de cellules épithéliales bronchiques humaines normales, a été obtenue par autopsie d'individus non cancéreux, puis transfectée par un adénovirus (Ad12SV40) et clonée.

Les cellules BEAS-2B ont été cultivées dans une atmosphère humide (95%), avec 5% de CO_2 à 37 °C, dans des flacons en plastique CellBIND® (Corning; Sigma-Aldrich) dans le milieu de culture défini LHC-9 (Fisher Bioblock). Avant d'atteindre 80% de confluence, les cellules ont été repiquées en utilisant une solution de trypsine à 0,25% / 0,53 mM de versène contenant 0,5% (m/v) de polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich). Le milieu de culture a ensuite été renouvelé tous les 3 jours.

2.2. Exposition des cellules aux particules atmosphériques

Les cellules BEAS-2B ont étéensemencées dans des microplaques Corning CellBIND®, soit à 6, soit à 96 puits, puis exposées pendant 6, 24, 48 ou 72 heures à des concentrations allant de 3 à 96 $\mu g/cm^2$ de particules ($PM_{2.5-0.3}$ / $NEM_{2.5-0.3}$) ou μg PM - $\acute{e}q/cm^2$ d'extraits ($EOM_{2.5-0.3}$ / $EOM_{0.3}$). Pour préparer les différentes solutions d'exposition (solutions de $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$ et $EOM_{0.3}$), une masse de particules ($PM_{2.5-0.3}$ ou $NEM_{2.5-0.3}$), déterminée en se basant sur la dose maximale d'exposition, est mise en suspension dans du milieu de culture LHC-9. La démarche est la même pour la préparation des extraits en considérant cette fois un volume d'extrait ($EOM_{2.5-0.3}$ ou $EOM_{0.3}$), équivalent à

la masse de particules extraite. Dans les deux cas, les solutions sont ensuite homogénéisées par traitements ultrasons et vortex. Les différentes doses sont obtenues par dilution successives de cette solution mère dans le milieu de culture.

Des cellules ont aussi été exposées à des témoins positifs dépendant du paramètre de toxicité étudié. Les différents contrôles positifs appliqués sont les suivants :

- **BaP** (25 µM, Sigma-Aldrich) : Contrôle positif des réponses biologiques liées aux HAPs.
- **1-NPyr** (25 µM, Sigma-Aldrich) : Contrôle positif des réponses biologiques liées aux N-HAPs.
- **9-FluO** (25 µM, Sigma-Aldrich) : Contrôle positif des réponses biologiques liées aux O-HAPs.
- **LPS** (1 µM, Sigma-Aldrich) : Inducteur des réponses inflammatoires.
- **Ménadione** (1 mM, Sigma-Aldrich) : Inducteur du stress oxydatif.
- **Rapamycine** (10 µM, Sigma-Aldrich) : Inducteur de l'autophagie cellulaire.
- **Staurosporine** (1 µM, Sigma-Aldrich) : Inducteur de l'apoptose.

Des cellules non-exposées dans du milieu de culture LHC-9 et dans du milieu de culture LHC-9 contenant 0,5% de DMSO ont été utilisées comme témoin pour l'exposition aux particules (PM_{2.5-0.3} et NEM_{2.5-0.3}) et aux extraits (EOM_{2.5-0.3} et EOM_{0.3}) respectivement.

2.3. Tests de cytotoxicité

La cytotoxicité globale des différents échantillons a été évaluée après exposition des cellules BEAS-2B à différentes concentrations d'extraits et pendant différents temps, par deux tests complémentaires : le dosage de l'ATP intracellulaire et de la glucose-6-phosphatase déshydrogénase (G6PD) extracellulaire.

2.3.1. Dosage de l'ATP intracellulaire

- Principe :

Le dosage de l'ATP a été réalisé en utilisant le kit « CellTiter-Glo®, Luminescent Cell viability assay » (Promega). Ce test permet de déterminer le nombre de cellules vivantes en se basant sur la quantification de l'ATP présent dans la cellule et qui est signe d'un bon fonctionnement mitochondrial. Le principe de cette méthode est explicité sur la **Figure 28** : il repose sur la transformation de la luciférine en oxyluciférine, en présence de Mg²⁺, d'ATP et

d'oxygène. L'intensité du signal luminescent est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans les cellules, et donc au nombre de cellules viables présentes dans le milieu de culture.

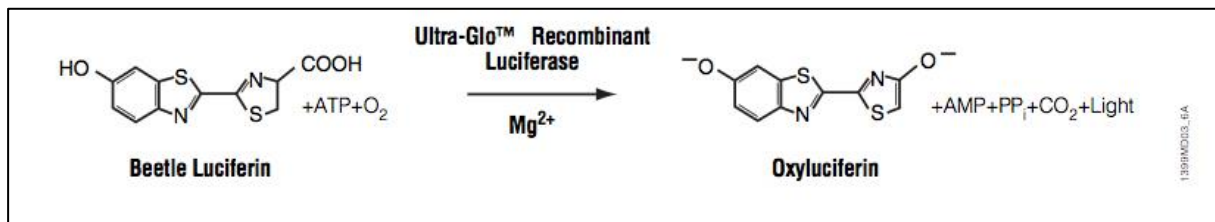


Figure 28 : Réaction de la luciférase : principe de la méthode de mesure de l'activité de l'ATP

- **Mode opératoire :**

Après exposition des cellules aux différents échantillons de PM pendant le temps prédéfini, 100 µL de "CellTiter-Glo™ reagent" sont ajoutés à 100 µL de suspension cellulaire dans des puits opaques. La plaque est ensuite homogénéisée pendant 2 min, incubée 10 min à température ambiante, puis la luminescence est mesurée.

2.3.2. Dosage de la G6PD extracellulaire

- **Principe :**

Après la mort des cellules, la membrane plasmique va se perméabiliser et provoquer le relargage des enzymes intracellulaires dans le milieu de culture. La G6PD fait partie de ces enzymes. Elle entre dans la voie des pentoses phosphates, une voie du catabolisme du glucose, générant le cofacteur NADPH. Sous le contrôle de la NADPH, deux réactions enzymatiques représentées sur la **Figure 29** permettent la quantification de la G6PD extracellulaire : l'oxydation du glucose 6-phosphate sous la G6PD en 6-phosphogluconate va permettre la génération de la NADPH, qui a son tour réduit la résazurine en résorufine fluorescente (rouge). L'intensité de la fluorescence obtenue est proportionnelle à quantité de G6PD relarguée par les cellules dans le milieu de culture. Le dosage de la G6PD extracellulaire a été réalisé en utilisant le kit «Vybrant™ cytotoxicity Assay Kit» (V-23111).

- **Mode opératoire :**

Les cellules BEAS-2B sontensemencées dans des microplaques 96 puits et exposées à des concentrations croissantes de PM_{2.5-0.3} allant de 3 à 96 µg/cm² pendant 3, 6, 24, 48 et 72 heures. Après exposition, 50 µL de surnageant sont transférés dans une plaque 96 puits, auxquels sont ajoutés 50 µL de la résazurine 2X préparée selon les instructions du kit. La microplaque est ensuite incubée à 37°C pendant 10 à 30 minutes. Le lecteur de microplaques

à fluorescence doit être équipé de filtres d'excitation et d'émission adaptés à la résorufine (excitation 530-560 nm, émission 580-600 nm). Plusieurs mesures sont effectuées à des intervalles de temps de 5 min.

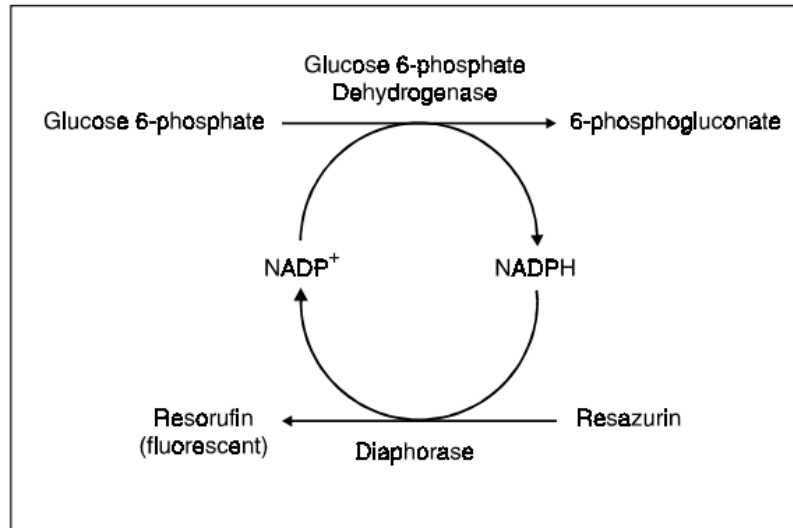


Figure 29 : Principe du dosage enzymatique de la G6PD

2.4. Evaluation de l'expression génique par RT-PCR

Au cours de ce travail de thèse, nous avons évalué l'expression des gènes impliqués dans la voie de métabolisation des HAP et dans la voie Nrf2 par PCR en temps réel-TaqMan[®], après exposition des cellules BEAS-2B, pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$) des différents échantillons. Les différents gènes testés sont listés dans le **Tableau 6**.

- **Mode opératoire:**

Après exposition des cellules aux différentes conditions ($\text{PM}_{2.5-0.3}$, $\text{EOM}_{2.5-0.3}$, $\text{NEM}_{2.5-0.3}$, $\text{EOM}_{0.3}$), pendant 6 et 24 heures à 3 et 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$, les cellules sont récupérées et les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit universel «DNA / RNA / miRNA AllPrep, QUIAGENE».

Après extraction des ARN, une reverse transcriptase (RT) prend place pour la synthèse de l'ADN complémentaire à partir des ARN extraits. Brièvement, 1 μg d'ARN a été mis en suspension dans un volume final de 30 μL , incluant 15 μL et du mélange réactionnel (3 μL RT-Buffer, 1,2 μL d'un mélange équimolaire de désoxynucléotides triphosphates, 3 μL d'amorces aléatoires, 1,5 μL de l'enzyme reverse transcriptase, de l'eau RNase-free, et 1 μL

d'inhibiteur de la DNase). Nous avons utilisé le Kit « RT High- Capacity cDNA Archive Kit – Applied Biosystems ».

Par la suite, 1 µg d'ADNc synthétisé est utilisé pour la PCR, dans un volume final de 9 µL (0,5 µL amorces, 5 µL Master mix contenant la sonde TaqMan et 3,5 µL d'eau déminéralisée).

Tableau 6 : Références des Taqman Gene Expression Assay utilisés pour l'étude de l'expression des gènes impliqués dans l'activation métabolique des HAP et dans la voie Nrf2.

	Gène	Abbréviation	Référence
Voie de métabolisation des HAPs	Aryl Récepteur d'hydrocarbures	<i>AhR</i>	Hs00169233_m1
	Répresseur de récepteurs aryl hydrocarbures	<i>AhRR</i>	Hs01005075
	Translocateur nucléaire de récepteurs aryl hydrocarbures	<i>ARNT</i>	Hs01121918_m1
	Cytochrome P4501A1	<i>CYP1A1</i>	Hs01054797_g1
	Cytochrome P4501B1	<i>CYP1B1</i>	Hs00164383_m1
	Epoxyde hydrolase 1	<i>EPHX-1</i>	Hs01116806_m1
	Glutathion S-transférase Alpha 4	<i>GSTA-4</i>	Hs01119249_m1
	Voie de défense antioxydante NRF2	nuclear factor erythroid-2-related factor 2	<i>NRF2</i>
Kelch-like ECH-associated protein 1		<i>KEAP-1</i>	hs00202227_m1
NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1		<i>NQO1</i>	hs01045993_g1
superoxyde dismutase		<i>SOD</i>	hs00162090_m1
Hème oxygénase		<i>HMOX</i>	hs01110250_m1
Gene de reference (House keeping gene)		<i>ARN18S</i>	Hs99999901

2.5. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales dans les échantillons va permettre de normaliser les valeurs obtenues lors des différentes expériences. Ceci rend la comparaison des résultats possible car rapportés à la même quantité de protéines et donc au même nombre de cellules.

- **Principe :**

Les protéines totales sont dosées à l'aide du kit «Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific». L'acide bicinchoninique (BCA) est utilisé pour la détection colorimétrique et la quantification des protéines totales. Le test BCA combine la réaction de réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines en milieu alcalin et la réaction colorimétrique basée sur la chélation de deux BCA et d'un ion Cu^+ .

- **Mode opératoire :**

La première étape de ce dosage est de préparer la gamme d'étalonnage à partir d'un standard de sérum d'albumine (BSA). 25 μL de standard ou d'échantillon à doser sont introduits dans les puits de la plaque, en plus de 200 μL de la solution "Working reagent".

La solution "Working reagent" est préparée à partir des deux réactifs fournis A (contenant la BCA) et B (contenant du sulfate de cuivre), avec une proportion A/B de 50/1). Après l'ajout de cette solution, la plaque est incubée sous agitation pendant 30 min à 37°C, et la lecture colorimétrique est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 562 nm. Pour chaque échantillon, la concentration en protéines totales a été déterminée en reportant sa mesure en absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue à partir de la gamme étalon.

2.6. Evaluation de l'effet génotoxique des PM

Comme mentionné dans le chapitre 1, l'exposition aux particules atmosphériques est associée à plusieurs impacts sur la santé humaine, pouvant même aboutir à un cancer pulmonaire (Karlsson et al., 2004). Vu la complexité des particules atmosphériques, l'identification et le rôle des composés responsables de l'effet génotoxique n'est pas encore clairement élucidé. Des études suggèrent le rôle des HAP, et donc de la fraction organique (Binková et al., 2003; Topinka et al., 2000). Afin d'évaluer l'impact des différentes fractions sur l'induction des mécanismes de génotoxicité, nous avons choisi d'évaluer la concentration des protéines impliquées dans la réponse cellulaire en cas de dommages à l'ADN incluant les protéines phosphorylées : p53 (Ser15), Chk1 (Ser 345), Chk2(Thr68), H2AX (Ser139), ainsi que les protéines totales : P21, MDM2 et ATR. L'évaluation de ces biomarqueurs a été réalisée après exposition des cellules BEAS-2B, pendant 24 et 48 heures, aux deux concentrations (3 et 12 $\mu\text{g PM-eq}/\text{cm}^2$) des différents échantillons **Figure 30**.

- **Principe :**

L'induction de la génotoxicité et les dommages à l'ADN par les différents échantillons, ont été évalués à différents niveaux en utilisant le kit «7-plex DNA Damage/ Genotoxicity Magnetic Bead Kit 96-well Plate-MILLIPLEX® MAP Kit».

Brièvement, un mélange de billes couplées chacune a un anticorps spécifique d'une protéine cible est ajouté à l'échantillon. Chaque bille, couplée à son anticorps déterminé, va reconnaître sa protéine cible. Un anticorps secondaire, couplé à la biotine, va permettre, après l'ajout de son substrat (streptavidine-phycoerycine), de quantifier relativement, par rapport au témoin, la fluorescence émise qui est à son tour, proportionnelle à la quantité de la protéine analysée.

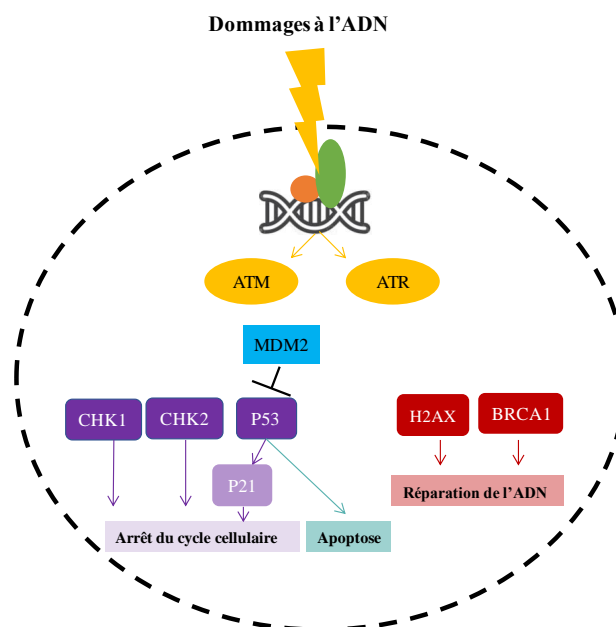


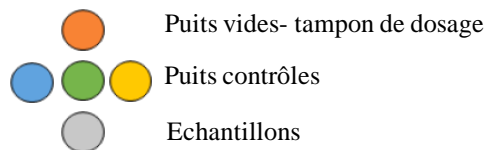
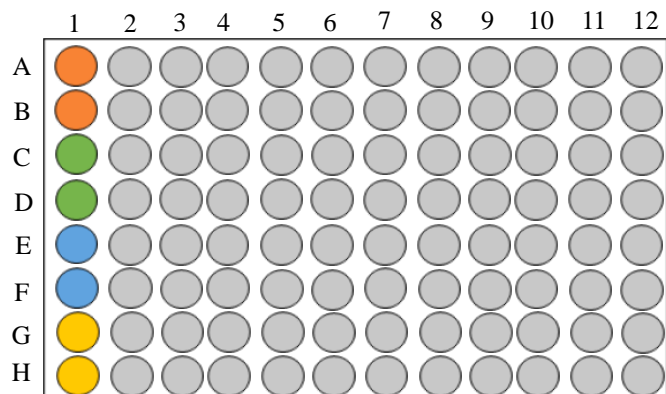
Figure 30 : Marqueurs de dommage à l'ADN/ génotoxicité étudiés

- **Mode opératoire :**

Après culture, exposition, récupération et filtration du lysat cellulaire, la démarche expérimentale, ci-dessous est suivie, selon les préconisations du fournisseur (**Figure 31**).

2.7. Evaluation de la réponse inflammatoire

Les cytokines sont des polypeptides immunomodulateurs qui jouent un rôle principal dans la réponse immunitaire innée et adaptative.



(7): - Eliminer la solution d'amplification et SAGE,
 - Remettre les billes en suspension dans 150µl de tampon de dosage
 - Lecture des résultats par l'instrument approprié (luminex)

Incubation 15 min, à température ambiante, sous agitation

(6): Ajouter 25µl de tampon d'amplification

(1): Lavage de la plaque: - Ajout de 50µl de tampon de dosage (Buffer Assay)
 - Agitation pendant 10 min
 - Elimination de la solution de lavage

(2): Ajouter: - 25µl de la solution de billes.
 - 25µl de tampon dosage dans les puits vides
 - 25µl d'échantillons ou de contrôles dans leur puits appropriés

Incubation toute la nuit, à 4 °C sous agitation

(3): Rinçage de la plaque avec 200µl du tampon de dosage afin d'éliminer les billes non fixées (2 fois): après ajout du tampon de dosage, fixer la plaque sur un bloc de séparation magnétique et renverser la plaque afin d'éliminer la solution de rinçage..

(4): Ajouter 25µl de la solution d'anticorps de détection (1X)

Incubation 1h, à température ambiante, sous agitation

(5): Eliminer la solution d'anticorps et rajouter 25µl de Stréptavidine-PE (SAGE)

Incubation 30 min, à température ambiante, sous agitation

Figure 31 : Protocole de dosage immunologique des biomarqueurs liés à l'induction des dommages à l'ADN et à la génotoxicité, adopté selon le kit «7-plex DNA Damage/ Genotoxicity Magnetic Bead Kit 96-well Plate-MILLIPLEX® MAP Kit».

Les cytokines agissent lors de la reconnaissance, de l'activation ou de la phase effectrice d'une réponse immunitaire, modulant le développement et les activités fonctionnelles des sous-types de cellules T, B et myéloïdes. Par conséquent, la recherche impliquant des cytokines joue un rôle important dans la compréhension du système immunitaire et de sa réponse multiforme à la plupart des antigènes, en particulier ceux qui constituent le processus inflammatoire.

Le déséquilibre dans la production de cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) contribue au dysfonctionnement immunitaire et intervient également dans l'inflammation des tissus et dans l'atteinte des organes (Lauwerys and Houssiau, 2003; Tackey et al., 2004).

Au cours de notre étude, nous avons évalué l'expression protéique des deux cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF- α) après exposition des cellules BEAS-2B, pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$) des différents échantillons.

- **Principe :**

Nous avons dosé les cytokines inflammatoires en utilisant le kit "Human high sensitivity T cell magnetic bead panel" et en se basant sur Luminex® xMAP® technology (même principe que le test appliqué pour le dosage des biomarqueurs de génotoxicité, 0).

- **Mode opératoire :**

Après culture, exposition, récupération et filtration du lysat cellulaire, la démarche expérimentale a été suivie selon les préconisations du fournisseur et est schématisée sur la **Figure 32**.

2.8. Détection des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La biotransformation des composés organiques tels que les HAP, ainsi que certains métaux contenus dans les particules, sont capables de générer des espèces réactives de l'oxygène, aboutissant à un état de stress oxydant cellulaire.

Au cours de notre étude, nous avons évalué la capacité des différents échantillons à induire la production des ERO (H_2O_2 et O_2^-) après exposition des cellules BEAS-2B aux deux concentrations, 3 et 12 $\mu\text{g/cm}^2$, pendant 6 et 24 heures.

(1): Lavage de la plaque: -Ajout de 200µL de tampon de dosage (Buffer Assay)
 -Agitation pendant 10 min
 -Elimination de la solution de lavage

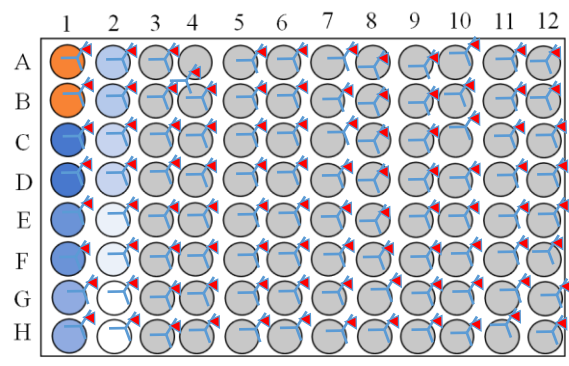


(2): Ajouter: - 50µL des standards en duplicat
 - 50µL de solutions de controle qualité
 - 25µL d'échantillons + 25µL tampon de dosage dans leur puits
 appropriés

Incubation toute la nuit, à 4°C sous agitation

(3): Rinçage de la plaque avec 300µL du tampon de dosage afin d'éliminer les billes non fixées (3 fois). Après l'ajout du tampon de lavage, la plaque est fixée sur un bloc magnétique, afin de fixer les billes dans les fonds des puits, et la solution de rinçage est éliminée par la suite par reversement.

(4): Ajout de 50µL de la solution d'anticorps de détection (1X) par puits, et incubation de la plaque pendant 1 heure a température ambiante sous agitation



Incubation 1h, à température ambiante, sous agitation

(11): Lecture des résultats par l'instrument approprié (luminex)

(10): Ajout de 150 µL du « Drive fluid » pour remettre en suspension les billes

(8): Rinçage de la plaque avec 200µL du tampon de dosage (2fois).

Incubation 30 min à température ambiante sous agitation



(7): ajout de 25µL par puits de la solution de Stréptavidine phycoérythrine.

(6): Rinçage de la plaque avec 300µL du tampon de dosage (3 fois)



Figure 32 : Protocole de dosage immunologique des cytokines inflammatoires, adopté selon le kit “Human high sensitivity T cell magnetic bead panel”.

La détection de l'ion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été réalisée par deux sondes fluorescentes, D11377 et D399 respectivement (Thermo Fisher SCIENTIFIC). La démarche expérimentale a été suivie selon les préconisations du fournisseur.

Le Dihydroéthidium (DHE, Thermo D11447) est oxydé par les des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (principalement les anions superoxydes) directement dans les cellules vivantes pour former du 2-hydroxyéthidium (2-OH-E⁺) (ex 500-530 nm / em entre 590 et 620 nm) ou par une oxydation non spécifique par d'autres sources d'ERO) pour former de l'éthidium (E⁺) (excitation 480 nm / émission 576 nm). Le DHE est utilisé comme sonde fluorescente pour la détection de la génération de ROS et est spécifique des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène.

Le diacétate de 6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescéine est une forme acétylée chimiquement réduite de fluorescéine utilisée comme indicateur des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules vivantes. Cette molécule non fluorescente est facilement convertie en une forme fluorescente verte lorsque les groupes acétate sont éliminés par des estérases intracellulaires et que l'oxydation par les ROS, et notamment le peroxyde d'hydrogène, se produit dans la cellule (Ex / Em: ~ 492–495 / 517–527 nm). L'analogue H2DCFDA carboxylé (carboxy-H2DCFDA, Thermo C400) possède deux charges négatives à pH physiologique. Lors du clivage des groupes acétate et ester par les estérases intracellulaires par les ROS intracellulaires, cet analogue forme de la carboxydichlorofluorescéine, avec des charges négatives supplémentaires qui empêchent sa sortie hors de la cellule. Une solution, à 1 μ M est ajoutée aux BEAS-2B, avec lecture de la fluorescence après 30 min d'incubation.

2.9. Evaluation de l'activité du récepteur Nrf2

Nrf2 est un facteur de transcription jouant un rôle primordial dans la défense contre le stress oxydant et est impliqué dans la régulation l'expression génique de plusieurs enzymes impliquées dans la défense anti-oxydante. Dans cette étude, nous avons évalué l'activité de la protéine NRF2 et donc sa capacité à se lier au niveau des régions spécifiques de l'ADN et à induire l'expression des enzymes à rôles antioxydants, suite à l'exposition des cellules

BEAS-2B pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$) des différents échantillons.

- **Principe :**

Nous avons dosé Nrf2 en utilisant le kit Trans-AM[®] Nrf2. Le principe de la mesure combine une analyse ELISA rapide avec un dosage sensible et spécifique du facteur de réduction. Trans-AM[®] Nrf2 contient une plaque à 96 puits sur laquelle a été immobilisé l'oligonucléotide contenant le site de liaison consensus ARE (5'-GTCACAGTGA^{CT}CAGCAGAATCTG-3'). La forme active de Nrf2 contenue dans l'extrait nucléaire se lie spécifiquement à cet oligonucléotide. Le premier anticorps utilisé pour détecter Nrf2, reconnaît un épitope sur la protéine Nrf2 lors de sa liaison à l'ADN. L'ajout d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP permet d'obtenir une lecture colorimétrique sensible quantifiée par spectrophotométrie (

Figure 33).

- **Mode opératoire :**

La démarche expérimentale a été suivie selon les préconisations du fournisseur, comme expliqué ci-dessous :

- **Etape 1 : Liaison de Nrf2 à sa séquence consensus.**

10 μL (2 à 20 μg) d'extrait nucléaire de protéines diluées dans le tampon de lyse (complete lysis buffer) et 40 μL de tampon de liaison (binding buffer) sont ajoutés dans chaque puit. La plaque est ensuite incubée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Après 1 heure d'incubation, la plaque est rincée 3 fois avec 200 μL du tampon de lavage.

- **Etape 2 : Liaison de l'anticorps primaire.**

100 μL d'anticorps primaire (dilution 1/1000) sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée 1 heure à température ambiante sans agitation, puis les puits sont rincés 4 fois (200 μL) avec le tampon de lavage.

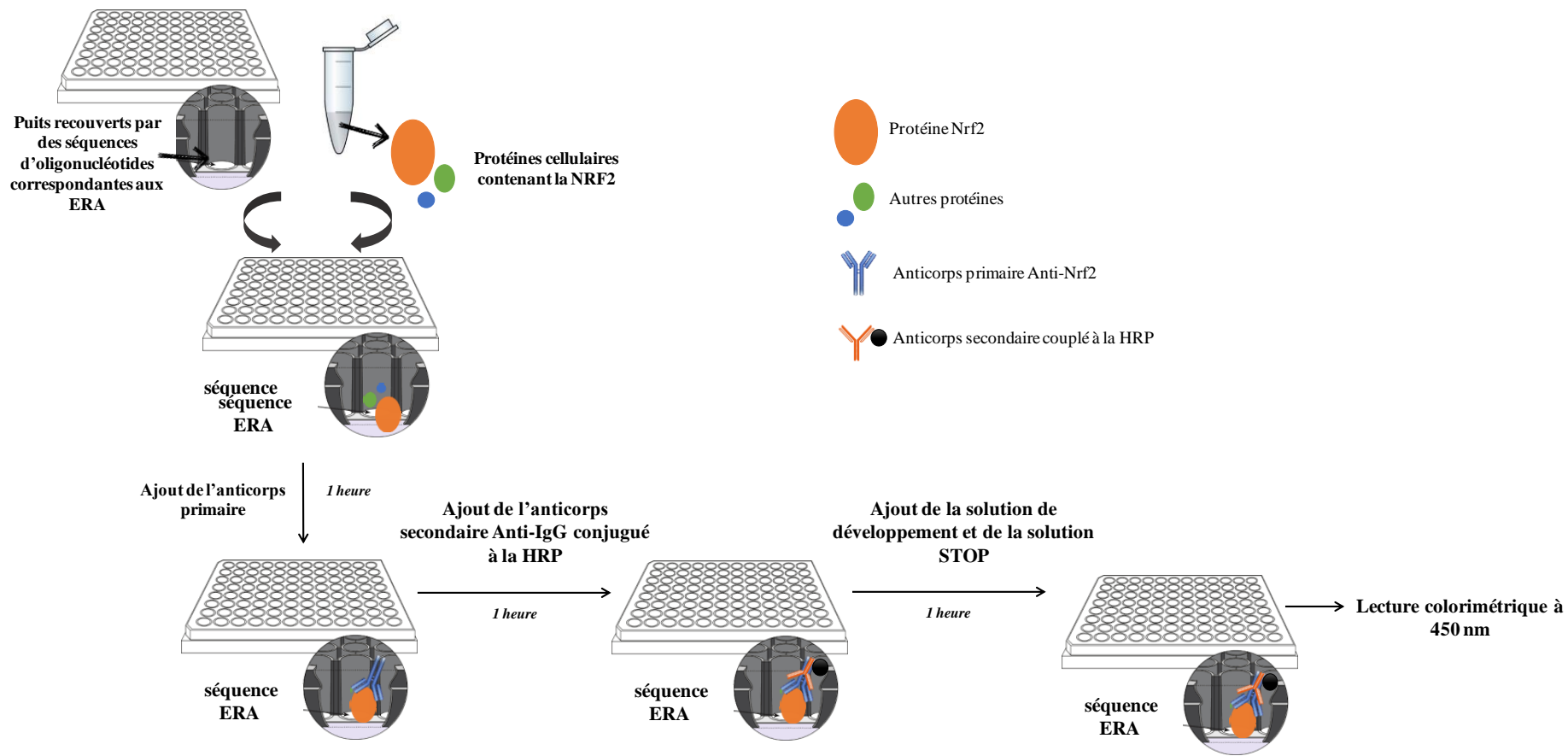


Figure 33 : Principe du test trans-AM® Nrf2 pour le dosage et quantification de la protéine Nrf2 active.

- **Etape 3 : Liaison de l'anticorps secondaire.**

100µl d'anticorps secondaire lié à l'HRP (dilution 1 :1000eme) sont ajoutés par puits et la plaque est incubée 1 h à température ambiante, sans agitation, puis les puits sont rincés 4 fois (200µL) avec le tampon de lavage.

- **Etape 4 : Réaction colorimétrique.**

100 µL de solution de développement sont ajoutés par puits et la plaque est incubée pendant 10 à 15 min dans le noir. Ensuite 100 µL de la solution "stop" sont ensuite ajoutés. L'absorbance est ensuite évaluée après 5 min à 450 nm grâce au spectrophotomètre TECAN, SPARK®.

2.10. Evaluation des lésions oxydatives à l'ADN, aux protéines et aux lipides

Les espèces réactives de l'oxygène produites durant la biotransformation des HAP ou bien générées par les métaux de transition tels que le Cu, Zn, Cr, Mn et Fe (toxicité directe ou réaction de Fenton) induisent des dommages cellulaires très graves, allant de l'oxydation des protéines et des lipides, jusqu'à l'attaque de l'ADN. Dans notre étude, nous avons évalué la capacité des différents échantillons à induire, suite à la production des ERO, des altérations au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires.

2.10.1 Dosage de la 8-OHdG

Pour évaluer les dommages oxydatifs à l'ADN, nous avons choisi de quantifier la 8-hydroxy-2-guanosine (8-OHdG) qui est produite suite à l'attaque oxydante, par les espèces réactives de l'oxygène, de la base guanine de l'ADN. La quantification de la 8-OHdG a été réalisée après exposition des cellules BEAS-2B pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 µg PM-eq/cm²) des différents échantillons.

- **Principe :**

Le principe de quantification de la 8-OHdG est décrit sur la **Figure 34**.

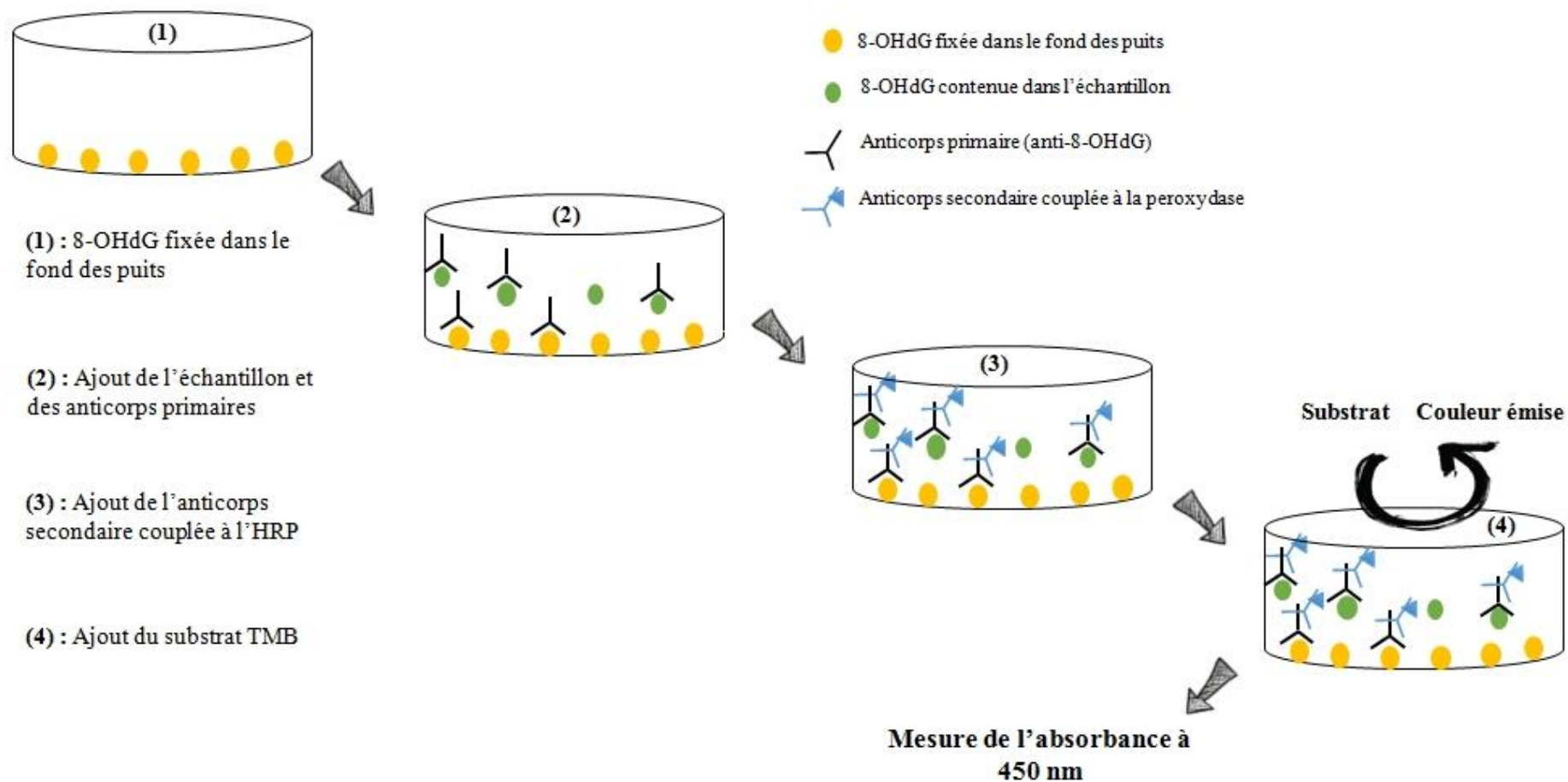


Figure 34 : Principe de dosage de la 8-OHdG dans les lysats cellulaires

- **Mode opératoire :**

Avant de quantifier la 8-OHdG, l'ADN a été fragmenté suivant le protocole suivant : 3 µL d'ADN ont été dilués avec de l'eau déminéralisée pour avoir un volume final de 80 µL. La solution obtenue est tout d'abord incubée 2 min à 100°C afin de permettre une dénaturation de l'ADN, puis toute la nuit (37°C), en présence de la nucléase P1, d'acétate de potassium et de sulfate de zinc, afin de fragmenter l'ADN. La phosphatase alcaline est ensuite ajoutée.

Après fragmentation de l'ADN, la solution obtenue est prête à être traitée et analysée selon le protocole du kit ab201734 (**Figure 34**). La quantification de la 8-OHdG est réalisée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm.

2.10.2. Dosage des protéines carbonylées

Dans notre étude, nous avons évalué la capacité des différents échantillons à induire, suite à la production des ERO, des altérations au niveau des protéines cellulaires. Pour cela, nous avons quantifié les protéines carbonylées qui ont des biomarqueurs immédiats de l'attaque oxydative des protéines. La quantification de ces protéines a été réalisée après exposition des cellules BEAS-2B pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 µg PM-eq/cm²) des différents échantillons.

- **Principe:**

Le marquage à la dinitrophénylhydrazine (DNPH) est une méthode commune utilisée pour la quantification des protéines carbonylées. La DNPH agit avec les aldéhydes et les cétones pour donner un précipité de DNP-hydrazone coloré.

- **Mode opératoire :**

Le protocole expérimental du dosage des protéines carbonylées est résumé sur la **Figure 35**, et le test a été appliqué selon les préconisations du fournisseur.

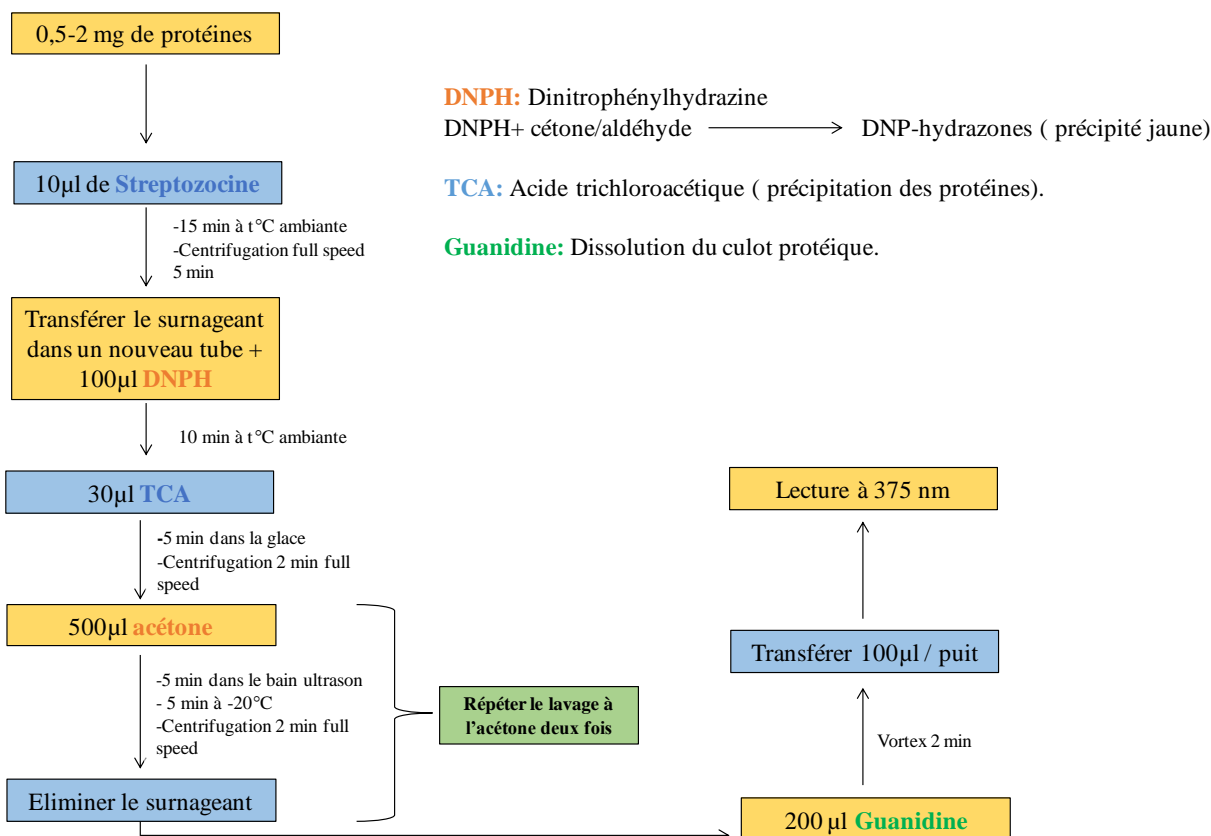


Figure 35 : Protocole de dosage des protéines carbonylées

2.10.3. Dosage de la 8-isoprostane

L'isoprostane (IsoP), appartenant à la famille des eicosanoïdes, est le résultat d'une oxydation des phospholipides cellulaires par les espèces réactives de l'oxygène et est couramment utilisé comme marqueur de cette oxydation. Dans notre étude, nous avons évalué la capacité des différents échantillons à induire des lésions aux lipides cellulaires via la quantification de l'isoP suite à l'exposition des cellules BEAS-2B pendant 6 et 24 heures, aux deux concentrations (3 et 12 µg PM-eq/cm²).

- Principe :

Le kit «Abcam 8-isoprostane» permet la quantification des 8-isoprostanes dans l'urine, le plasma, le sérum, ainsi que dans les tissus et les cellules, en se basant sur le principe d'une ELISA compétitive, après isolation et purification des eicosanoïdes.

- Mode opératoire :

a. Purification des eicosanoïdes : Après récupération des cellules exposées, un antioxydant a été rapidement ajouté (TPP ; triphénylphosphine ; 0,1 mM) afin de protéger

l'échantillon. Puis une solution d'acide acétique est ajoutée afin d'acidifier l'échantillon (pH 3-4), permettant la précipitation des protéines. Une extraction à l'acétate d'éthyle (v/v) répétée 3 fois permettra la récupération des produits. Après évaporation, 10 µL d'éthanol sont ajoutés préalablement à l'ajout de 0,5 mL de tampon de dilution fourni par le kit. L'échantillon ainsi obtenu est prêt pour le dosage de la 8-isoP selon les préconisations du fabricant dont le protocole est brièvement décrit ci-dessous.

- b. Dosage de la 8-isoP :** Brièvement, 200 µL du tampon de dilution sont ajoutés dans les puits témoins, 100 µL de standard et 100 µL d'échantillon sont ajoutés dans les puits appropriés et 100 µL d'anticorps couplé à la peroxydase (1X) sont ajoutés dans tous les puits, sauf dans les puits témoins. La plaque est ensuite incubée pendant 2 heures à température ambiante. Par la suite, la plaque est rincée 3 fois avec 400 µL de la solution tampon de rinçage, et 200 µL du substrat tétraméthylbenzidine (TMB, révélateur de la peroxydase) sont ajoutés. 30 min plus tard, 50 µL d'acide N-sulfurique sont ajoutés afin de stopper la réaction et la lecture de l'absorbance est réalisée à 450 nm.

2.11. Dosage protéique des marqueurs de l'autophagie par western blot

L'évaluation de l'autophagie cellulaire a été réalisée par dosage de différentes protéines impliquées dans cette voie, tels qu'ATG5, LC3-b, Parkin-1, Beclin-1 et P62, suite à l'exposition des cellules BEAS-2B, pendant 24 et 48 heures, à une concentration de 12 µg PM-eq/cm² des différents échantillons

- Principe :

Le Western Blot (aussi appelé immunotransfert) est une technique permettant d'analyser des protéines individuelles dans un mélange protéique. Dans un premier temps, le mélange protéique est soumis à une électrophorèse sur gel (SDS-PAGE), afin de trier les protéines selon leur taille : les protéines les plus petites vont migrer plus rapidement, alors que la migration des plus grandes va être ralentie. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF). La membrane est ensuite incubée toute la nuit avec un anticorps primaire qui cible la protéine d'intérêt, puis incubée avec un anticorps secondaire dirigée vers l'anticorps primaire. Enfin, les bandes protéiques sont révélées par chimioluminescence.

- **Mode opératoire :**

Après exposition des cellules aux différents échantillons, les cellules sont récupérées et lysées dans du RIPA (Tris-HCl 25 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, NP-40 à 1 %, désoxycholate de sodium à 1 %, SDS à 0,1 %). Les protéines totales sont ensuite dosées par dosage BCA (**voir partie C. 2.5 de ce chapitre**).

Des solutions contenant 10 µg de protéines sont préparées dans un volume final de 25 µL, en présence d'un agent réducteur (10X) et d'une solution de bleu (4X). Un volume de 20 µL est ensuite déposé sur les gels NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1,5 mm, 15 puits.

La migration des protéines dans le gel est assurée par le courant électrique associé à une tension de 0,3 volts et une puissance de 150 A. Une fois la migration terminée, le gel est retiré délicatement puis les protéines sont transférées sur une membrane PVDF dans une cassette, par le système "Trans- Blot Turbo Transfert System- BIO-RAD", pendant 7 min sous une tension de 21 Volts. La cassette de transfert est schématisée sur la **Figure 36**.

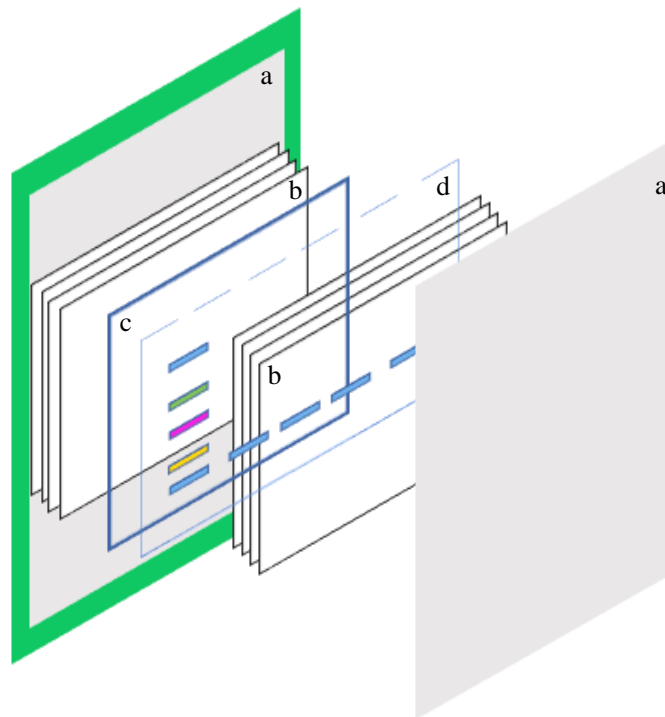


Figure 36 : Schéma représentatif de la cassette de transfert des protéines du gel à la membrane ((a) Cassette Bio-Rad, (b) éponges Watmann, (c) membrane PVDF, (d) Gel).

Une fois le transfert terminé, la membrane est rincée 3 fois (deux rinçages au TBS 1X (Tris-Buffered Saline), et un au TBS 1X-Tween (0.05%). Après rinçage, la membrane est saturée par du lait de vache à 5% afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps par la suite. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps cible de la protéine d'intérêt (**Tableau 7**).

Le lendemain, la membrane est rincée (2 rinçages au TBS 1X (Tris-Buffered Saline), et au TBS1X-Tween (0,05%) et l'anticorps secondaire est ajouté (anti-souris ou anti-lapin) (**Tableau 7**) pendant 1 heure. Après 1 heure d'incubation, la membrane est rincée de la même manière, et les bandes protéiques sont analysées en présence d'un tampon de révélation (GE Health care, Amersham ECL-select™), par le système FUSION FX Spectra.

Tableau 7 : Liste des différentes protéines analysées par western blot.

Protéine analysée	Poids moléculaire (kDa)	référence	Anticorps secondaire
ATG5	55	NB110-53818 Novus Bio	Anti-lapin (NB7160 Novus Bio)
LC3-B	15	NB100-2220 Novus Bio	Anti-lapin (NB7160 Novus Bio)
Beclin-1	60	NB500-249 Novus Bio	Anti-lapin (NB7160 Novus Bio)
Parkin-1	75	MAB1438 R&D	Anti-souris (7076S Cell signaling)
P62	62	H00008878-M01 Novus Bio	Anti-souris (7076S Cell signaling)
Actine	42	MAB8929 R&D	Anti-souris (7076S Cell signaling)

2.12. Immunocytochimie

L'immunocytochimie est une technique qui permet d'analyser les cellules in-situ. Cette technique va permettre de cibler et localiser une molécule biologique à l'échelle cellulaire, grâce à des anticorps spécifiques. Dans notre étude, nous avons ciblé 3 protéines cellulaires AHR, NRF2 et LCB-II afin de localiser l'AHR et NRF2 après exposition aux PM et d'évaluer le processus d'autophagie cellulaire, par le suivi des autophagosomes, en marquant LC3B-II. Les cellules ont étéensemencées dans des systèmes de chambre de culture sur lame « Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™, Thermofischer Scientific » (4 ou 8 puits) et exposées soit à une concentration de 12 µg PM-eq/cm² d'EOM_{0,3} pour évaluer la

localisation de Nrf2 et de l'AhR, soit à une concentration de 12 µg PM-eq/cm² de PM_{2.5-0.3} pour évaluer la formation des autophagosomes.

Après exposition, les cellules sont rincées au PBS 1X (3 x 500 µL), puis fixées au formaldéhyde 1% (v/v) pendant 3 min à 37°C. Le formaldéhyde est ensuite éliminé et les cellules sont rincées au PBS1X (3 x 500 µL). Du méthanol à -20°C est ensuite ajouté pendant 5 min, suivi d'un rinçage au PBS comme cité précédemment. Les cellules sont ensuite bloquées dans une solution de blocage pour 60 min (1X PBS, 5% normal sérum, 0,3% Triton X100). Après 60 min de blocage, la solution de blocage est éliminée, et les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué au 1/500^{ème} avec la solution de dilution (1X PBS, 1% BSA, 3% Triton X100). Les cellules sont ensuite mises à incuber pendant 2 heures à température ambiante, dans le noir, après avoir ajouté l'anticorps secondaire.

Après deux heures d'incubation, les cellules sont rincées 3 fois au PBS pendant 5 min et 100 µl du SlowFade®Gold Antifade Mountant With DAPI (Life technologies) sont ajoutés à la lame. Les images ont été réalisées avec un EVOS™ FL Cell Imaging System (Thermo Fischer Scientific).

2.13. Dosage des Caspases

L'induction de l'apoptose a été évaluée par dosage des caspases initiatrices 8 et 9 et les caspases effectrices 3/7, suite à l'exposition des cellules BEAS-2B, pendant 24 et 48 heures, à une concentration de 12 µg PM-eq/cm² des différents échantillons.

Le dosage des caspases a été réalisé à l'aide des kits « Caspase-Glo® 3/7 Assay, Caspase-Glo® 8 Assay et Caspase-Glo® 9 Assay » selon les préconisations du fournisseur.

Le principe de ces tests est basé sur la quantification de la luminescence émise suite au clivage des substrats spécifiques des caspases greffés sur la molécule de la luciférase. L'action des caspases présentes au sein de nos échantillons la luciférase va être libérée et transformée en luciférine luminescente. La quantité de la luminescence est ainsi proportionnelle au taux de caspases présents dans les échantillons dosés.

3. Analyses statistiques

Les résultats ont été normalisés par rapport au témoin et sont présentés sous la forme d'une moyenne et d'un un écart-type. Pour chaque temps d'incubation, les résultats

d'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$ et $EOM_{2.5-0.3}$ ou aux contrôles positifs BaP, 1-NPyr et 9-FluO ont été comparés à ceux obtenus à partir de cellules non exposées à l'aide du test non paramétrique U de Mann – Whitney (logiciel SPSS). Des différences significatives ont été rapportées avec des valeurs de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0.001$ (***)).

Le schéma ci-dessous (**Figure 37**) résume les différents paramètres évalués durant l'étude préliminaire et l'étude approfondie réalisées au cours de ce travail de recherche.

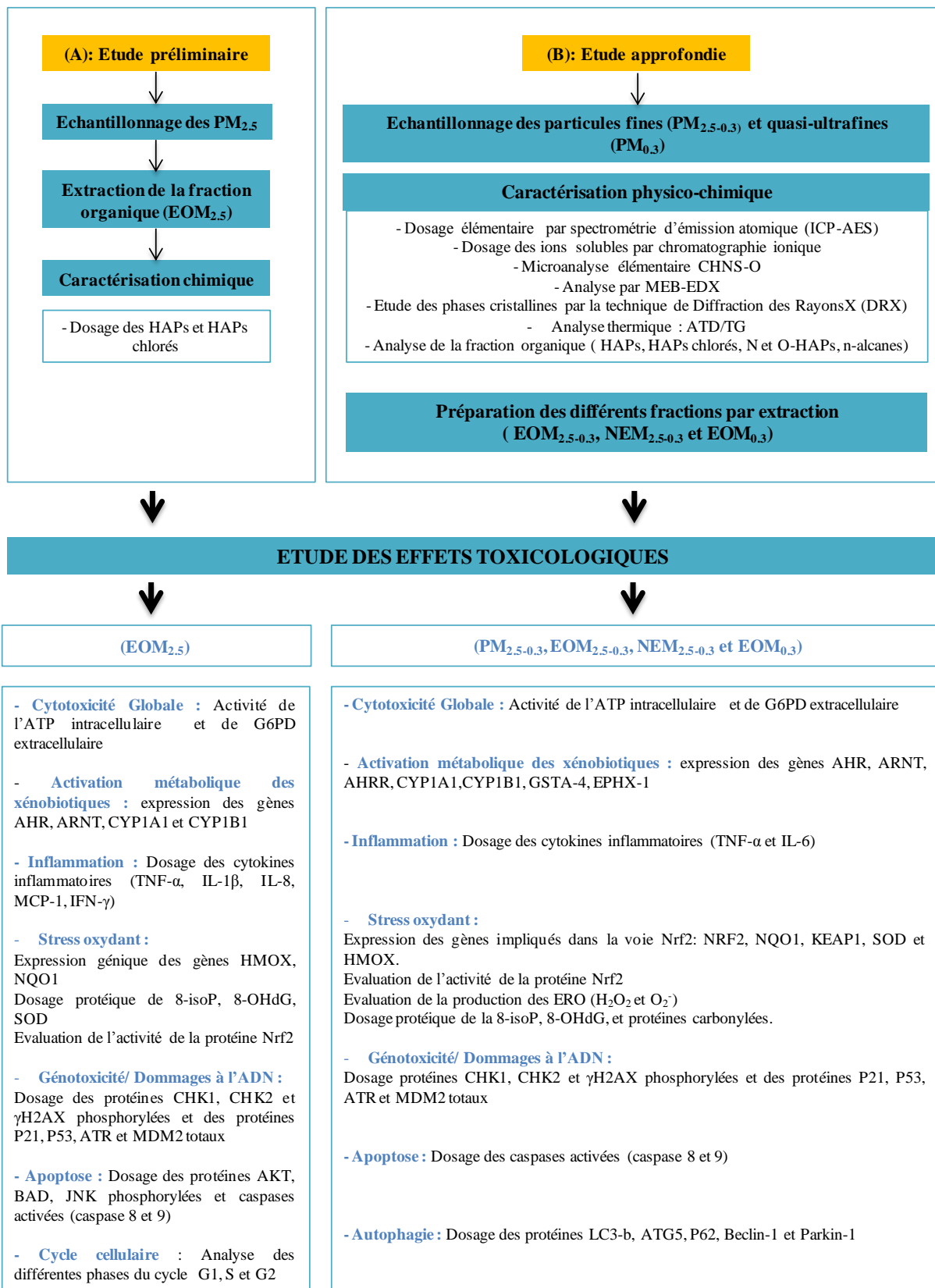


Figure 37 : Schéma récapitulatif des différents paramètres étudiés au cours de l'étude préliminaire et approfondie de ce travail de recherche.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

Dans ce chapitre, les résultats obtenus au cours de nos travaux de recherche seront présentés sous forme d'articles. Le premier est publié dans le journal « Environmental Research », le deuxième dans « Chemosphere » et le troisième soumis à « Environmental Pollution ».

Article 1 :

Ghidaa BADRAN (co-first author), Imane ABBAS (co-first author), Anthony VERDIN, Frédéric LEDOUX, Mohamed ROUMIE, Jean-Marc LO GUICIDE, Dominique COURCOT, Guillaume GARÇON. 2019. **In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial Beas-2B cells: cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation.** Environmental Research, 171, 510-522, doi : 10.1016/j.envres.2019.01.052.

Article 2 :

Ghidaa BADRAN, Frédéric LEDOUX, Anthony VERDIN, Imane ABBAS, Mohamed ROUMIE, Paul GENEVRAY, Yann LANDKOCZI, Jean-Marc LO GUICIDE, Guillaume GARÇON, Dominique COURCOT. 2019. **Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions.** Chemosphere, 243, 125440, doi : 10.1016/j.chemosphere.2019-125440.

Article 3 :

Ghidaa BADRAN, Anthony VERDIN, Céline GRARE, Djamal ACHOUR, Imane ABBAS, Frédéric LEDOUX, Mohamed ROUMIE, Fabrice CAZIER, Dominique COURCOT, Guillaume GARÇON. 2019. **Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial beas-2b cells** (soumis à Environmental Pollution).

III. Article 1

***In-vitro* evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation.**

Publié dans « Environmental Research »

171 (2019) - 510-522

doi :10.1016/j.envres.2019.01.052

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études *in-vitro* ont été menées afin de déterminer les effets toxiques des PM_{2.5}, que ce soit au niveau cellulaire ou moléculaire. Cependant, il demeure un manque de connaissances certain sur la relation de causalité entre caractéristiques physico-chimiques des particules atmosphériques, leurs effets toxiques, les mécanismes d'action impliqués, et notamment sur ce qui, au sein des PM_{2.5} est responsable des effets observés. La littérature décrit le rôle critique de la fraction organique extraite des particules en suspension dans l'air dans la toxicité des PM. Cependant, des recherches toxicologiques complémentaires sont nécessaires pour déchiffrer les mécanismes sous-jacents qui seraient mis en jeu (Akhtar et al. 2010, Alessandria et al. 2014, De Brito et al. 2013, Healey et al. 2006, Oh et al. 2011, Xiang et al. 2018).

Le but de cette étude préliminaire visait à mieux comprendre les effets toxiques d'un extrait organique (EOM_{2.5}) préparé à partir de PM_{2.5} échantillonnées au Liban, sur un site urbain présentant une typologie routière, à Beyrouth, sur des cellules épithéliales bronchiques humaines, les BEAS-2B, cultivées *in-vitro*. Après échantillonnage des PM_{2.5}, extraction et caractérisation de la fraction organique (HAP, dioxines, furanes et PCBs), différents paramètres de toxicité ont été évalués. Nous avons tout d'abord réalisé une étude de cytotoxicité globale par dosage de l'ATP intracellulaire et de la G6PD extracellulaire lors de l'exposition des cellules à des concentrations d'EOM_{2.5} allant jusqu'à 30 µg PM- $\dot{e}q/cm^2$ et pour 3 temps d'incubation 6, 24 et 72 h. Cette première étape nous a permis de sélectionner trois doses et deux temps d'intérêt pour l'étude du stress oxydant, de la réponse pro-inflammatoire, ainsi que la capacité des composés organiques extraits à induire une génotoxicité et une dérégulation du cycle cellulaire. La **Figure 38** résume la démarche appliquée dans cette étude.

La concentration atmosphérique moyenne de PM_{2.5} durant la période d'échantillonnage était de 48 µg/m³. La concentration totale moyenne des HAP, PCDD et PCDF dans les PM_{2.5} était de l'ordre de 9,7ng/m³, 449 fg/m³ et 560 fg/m³ respectivement, valeurs supérieures à celles observées dans des études précédentes menées à Beyrouth (Borgie et al. 2015a).

L'étude des effets toxiques a montré une augmentation significative de l'activité de NRF-2 et de la SOD, une augmentation significative de l'expression génique d'HMOX et NQO1, ainsi que des dommages oxydatifs à l'ADN et à la membrane cellulaire mis en évidence par dosage de la 8-OHdG et de la 8-isoP respectivement. Par ailleurs l'exposition aux EOM_{2.5} n'a entraîné aucun changement significatif dans la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 et IFN γ). De plus, cet extrait riche en HAP et autres composés organiques a été capable d'induire l'expression génique des CYP1A1 et 1B1.

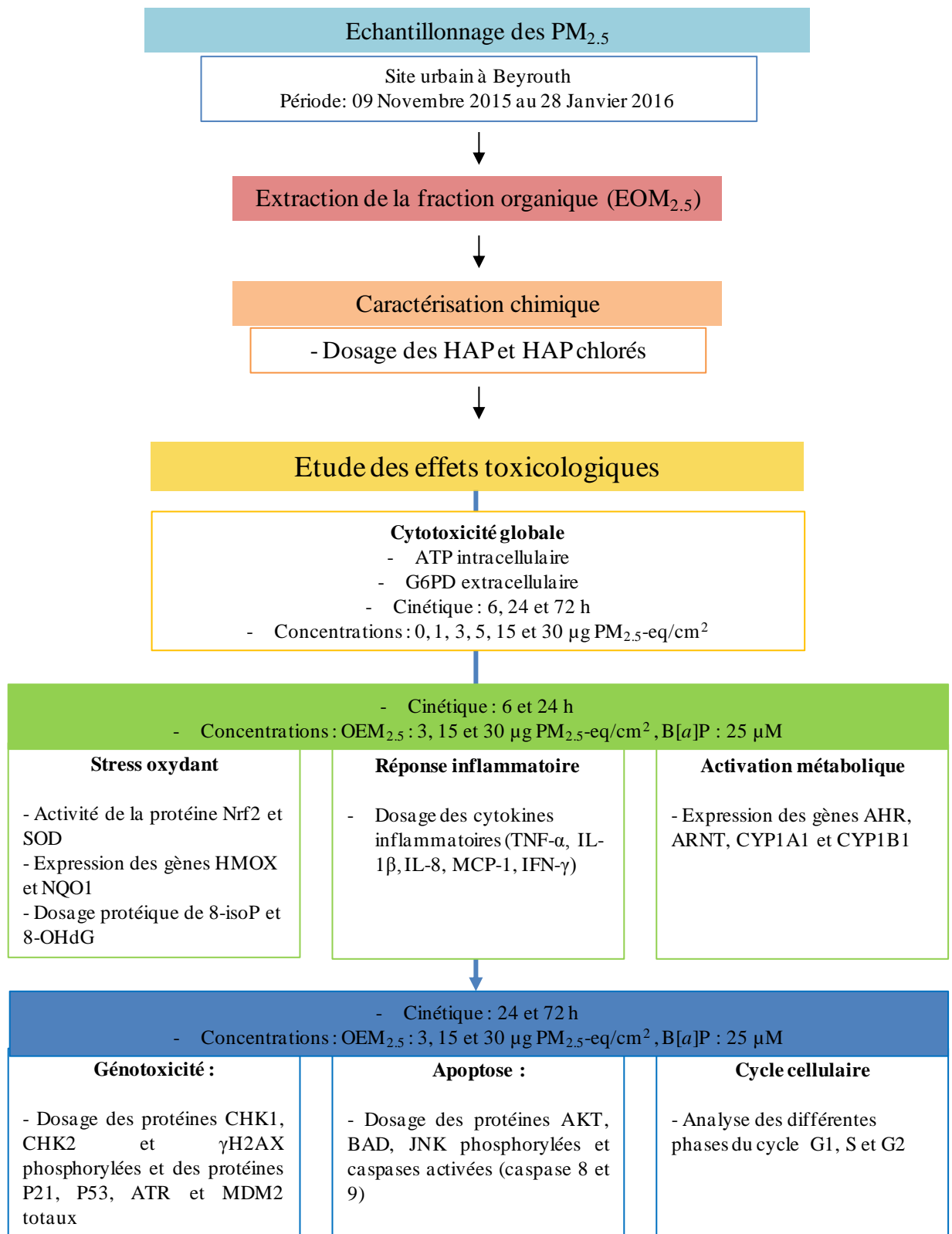


Figure 38 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.

L'évaluation des biomarqueurs de génotoxicité a montré une diminution significative de la protéine γH2AX phosphorylée et une augmentation du taux des protéines phosphorylées CHK-1 et CHK-2 contribuant à l'arrêt du cycle cellulaire. La phosphorylation de la γH2AX est révélatrice

d'une activation du système de réparation de l'ADN, alors que P53 et les CHK-1 et 2 sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire.

L'évaluation des différentes phases de ce cycle, a montré un blocage des cellules en phase G1/S et intra-S-checkpoint. De plus, une augmentation significative de la protéine AKT phosphorylée a été observée. Cette augmentation contribue à l'inhibition des facteurs apoptotiques et provoque une survie cellulaire. L'inhibition de l'apoptose a été validée par une inhibition de l'expression des caspases 8 et 9.

La **Figure 39** résume les différents résultats de l'étude décrite dans cet article I. Dans cette première partie du travail de thèse, nous avons quantifié les teneurs en HAP et autres composés organiques tels que les dioxines, les furanes et les PCB, dans l'EOM_{2.5} obtenu à partir de PM_{2.5} collectées en milieu urbain. Les composés pouvant déclencher certains mécanismes de toxicité, une exposition des cellules BEAS-2-B à cet extrait, à des concentrations relativement faibles a été réalisée et a permis de montrer une activation des voies de signalisation AhR et Nrf2, ainsi que des lésions oxydatives cellulaires. Contrairement à l'effet observé lors de l'exposition des cellules aux particules, les composés organiques extraits n'ont pas déclenché de réponse inflammatoire.

De plus, ces résultats ont montré la capacité de l'extrait EOM_{2.5} à provoquer la dérégulation cellulaire, notamment en bloquant le cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S et intra-S, tout en assurant la survie cellulaire *via* l'inhibition de l'apoptose.

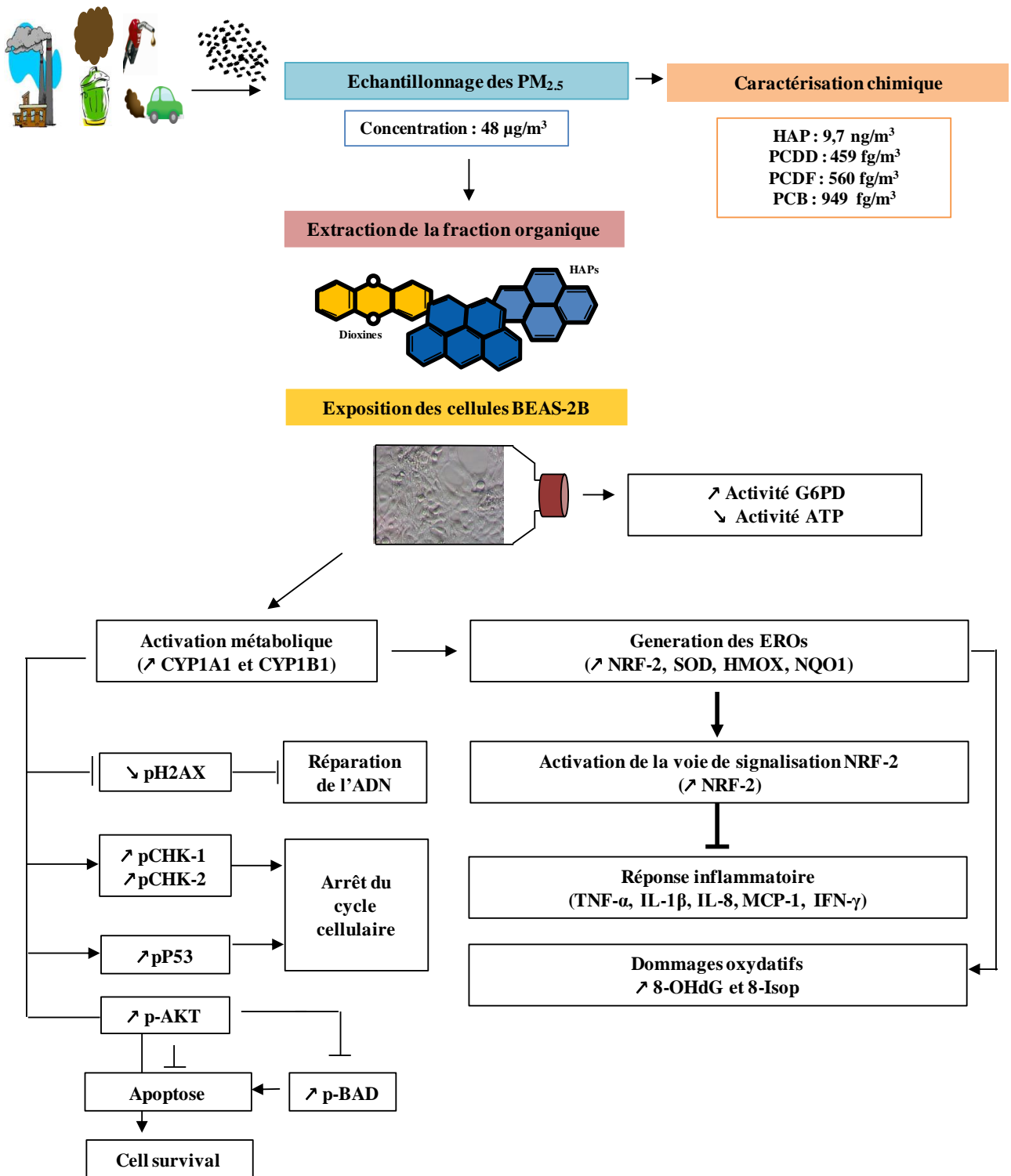


Figure 39 : Représentation schématique des différents résultats obtenus durant l'étude.

1 **IN VITRO EVALUATION OF THE ORGANIC EXTRACTABLE MATTER FROM FINE PARTICLES**
2 **USING HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL BEAS-2B CELLS: CYTOTOXICITY, OXIDATIVE**
3 **STRESS, PRO-INFLAMMATORY RESPONSE, AND GENOTOXICITY.**

4
5
6
7 **Imane ABBAS¹, Ghidaa BADRAN^{1,2,3,*}, Anthony VERDIN², Frédéric LEDOUX², Mohamed ROUMIE¹, Jean-**
8 **Marc LO GUIDICE³, Dominique COURCOT¹, Guillaume GARÇON^{3,*}**

9
10
11
12 ¹ Lebanese Atomic Energy Commission – NCSR, Beirut, Lebanon;

13 ² Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, UCEIV EA4492, FR CNRS 3417, Univ. Littoral
14 Côte d’Opale, Dunkirk, France ;

15 ³ CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPacts de l’Environnement Chimique sur la Santé Humaine
16 (IMPECS), Univ. Lille, Lille, France;

17 * Both authors equally contributed and should be considered as co-first authors
18
19
20

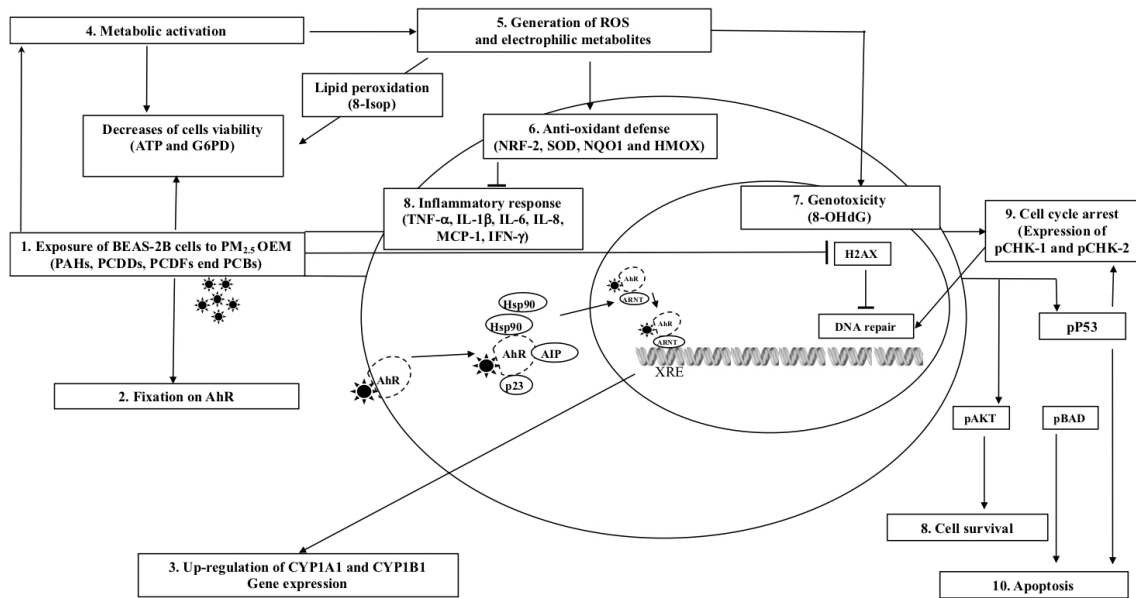
21 **Corresponding Author:** Guillaume GARÇON, IMPacts de l’Environnement Chimique sur la Santé Humaine
22 (IMPECS), Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Univ. Lille, Lille, France, Phone number : +33-320626818, E-mail :
23 guillaume.garcon@univ-lille.fr.

1 **ABSTRACT**

2
3 A particular attention has already been devoted to the type of biological responses induced by particulate matter
4 (PM) samples, since their knowledge is greatly complicated by the fact that it is a heterogeneous and often poorly
5 described pollutant. However, despite intensive research effort, there is still a lack of knowledge about the specific
6 chemical determinants within air pollution-derived PM_{2.5}, which could be mainly responsible of its adverse health
7 effects. In this work, we sought to better investigate the toxicological effects of air pollution-derived organic
8 extractable matter (OEM) in human bronchial epithelial lung BEAS-2B cells. The wide variety of chemicals
9 including PAH and other related-compounds found within this OEM has been rather associated with early oxidative
10 events, as closely supported by the activation of the NRF-2 signaling pathway. For the most harmful conditions, the
11 activation of the NRF-2 signaling pathway could not totally counteract the ROS production, thereby leading to
12 oxidative damage to critical macromolecules (e.g. 8-isoP, 8-OHdG). While NRF-2 is an anti-inflammatory, OEM
13 exposure did not trigger any significant change in the secretion of some proinflammatory cytokines (*i.e.*, TNF α , IL-
14 1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, and IFN γ). According to the high concentrations of PAH and other related compounds within
15 this OEM, *CYP1A1* and *IB1* genes exhibited high transcription levels in BEAS-2B cells, thereby supporting the
16 activation of the AhR signaling pathway and leading to the formation of carcinogenic diol epoxides. As a
17 consequence, genotoxic events could occur in BEAS-2B cells exposed to this OEM together with some cell survival
18 and cell death events, with possible harmful consequences in term of cell cycle deregulation. However, more studies
19 are required to implement these reported alterations, thereby contributing to better decipher the critical role of the
20 organic fraction of fine particulate matter to activate some sensitive signaling pathways closely involved in cell
21 survival or cell death.

22
23 **Keywords:** Fine particulate, organic extractable fraction, oxidative stress, inflammation, genotoxicity, cell
24 survival/apoptosis

1
2 **Graphical abstract:**



8-Isop: 8-Isoprostane, 8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, AhR: aryl hydrocarbon receptor, ATP : Adenosine triphosphate, CYP1A1: cytochrome P450 1A1, CYP1B1: cytochrome P450 1B1, G6PD: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, H2AX: phosphorylated H2A histone family member X, HMOX: heme oxygenase 1, NQO1: NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NRF-2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2, PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pAKT : phosphorylated protein kinase B, pBAD: phosphorylated Bcl-2-associated death promoter, PCBs: PolyChloroBiphenyls, PCDDs: PolyChloro Dibenzo-p-Dioxins, PCDFs: PolyChloroDibenzofurans, pCHK-1: phosphorylated checkpoint kinase 1, pCHK-2: phosphorylated checkpoint kinase 2, p53: phosphorylated protein 53, ROS: reactive oxygen species, SOD: superoxide dismutase.

3
4

1 1 - INTRODUCTION

2
3 Nowadays, air-pollution-derived particulate matter (PM) is fully acknowledged to be a major public health
4 problem, responsible for several hundreds of thousands of premature deaths and the loss of millions of dollars yearly
5 in health care (A.Q.i.E. 2016). Fine fraction of the particulate matter (PM_{2.5}) corresponds to a heterogeneous mixture
6 of organic and inorganic compounds, from natural and anthropogenic sources, and their chemical composition varies
7 as a function of location and season depending on the diversity of sources and the effects of atmospheric processes
8 (Abbas *et al.* 2018). Due to their size, PM_{2.5} constitute a serious health hazard. After penetration deeply in the
9 tracheobronchial and alveolar regions, it can either exert its toxicity within the lungs or, after translocation through
10 the lung barrier, it could be distributed through the blood circulation into the whole body (Cao *et al.* 2014; Liu *et al.*
11 2016; Pui *et al.* 2014; Van Winkle *et al.* 2015). Some epidemiological studies have shown a significant correlation
12 between long-term exposure to PM_{2.5} and the initiation and/or exacerbation of a wide range of adverse effects on
13 human health, including asthma, lung cancer, other respiratory and cardiovascular diseases, and premature death
14 (Kim *et al.* 2016; Weber *et al.* 2016; Xing *et al.* 2016). In 2013, the international agency for research on cancer
15 (IARC) has classified PM_{2.5} outdoor air pollution as carcinogenic to humans, based on sufficient evidence of
16 carcinogenicity in humans and experimental animals (Loomis *et al.* 2013).

17 Over the last two decades, *in vitro* toxicology methods have been heavily used as they constitute a relevant
18 approach for determining and describing the underlying mechanisms involved in air pollution-derived PM_{2.5} toxicity
19 at cellular and molecular scales. However, despite intensive research effort, there is still a lack of knowledge about
20 the specific chemical determinants within air pollution-derived PM_{2.5}, which could be mainly responsible of its
21 adverse health effects. A particular attention has also been devoted to the type of biological responses induced by PM
22 samples, since their knowledge is greatly complicated by the fact that PM is a heterogeneous and often poorly
23 described pollutant (Perrone *et al.* 2013). A great deal of efforts has also been done to identify some characteristic
24 patterns of *in vitro* toxicological response specifically related to air pollution-derived PM. In this respect, Lonkar and
25 Dedon (2010) supported the current hypothesis that air pollution-derived PM with higher participation of crustal
26 elements was predominantly associated with some molecular and cellular effects participating in severe health
27 processes like chronic inflammatory lung diseases. On the other hand, PM with larger anthropogenic participation
28 may have a higher impact on lung and systemic cardiovascular diseases, due to its stronger oxidative and
29 proinflammatory potentials. In contrast, Gualtieri *et al.* (2010) and Perrone *et al.* (2010) reported that some coarse
30 PM showing the presence of crustal elements, ions and metals, contributed to cause oxidative stress and, thereafter,
31 inflammation, but, on the contrary, other coarse PM triggered inflammation through a reactive oxygen species
32 (ROS)-independent pathway, as ROS levels were not significantly altered. Their results pertinently supported the
33 growing evidence that PM-size, composition and origin interact in a complex manner together with the own
34 responsiveness of the cell models under study to trigger the adverse health effects of air pollution-derived PM.
35 Hence, while the inclusion of inorganic constituent grouping provided useful information about the differential
36 effects of PM components and sources, it is worthy to extend such approach to organic constituents. Towards this
37 end, Delfino *et al.* (2010) stated that, despite a higher presence of metals within fine and quasi-ultrafine PM,
38 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were the major redox-active components, and thereafter, inflammatory
39 response inducers. Longhin *et al.* (2013) indicated that low doses of PM_{2.5} with high quantities of PAHs induce an

1 early cell cycle arrest with a subsequent inhibition of cytokinesis and, in contrast, induction of DNA damages.
2 Noteworthy of mention is the expectable role of endotoxins in leading the PM-induced inflammatory effects even if
3 their inhibition did not completely block the inflammatory process, thereby suggesting the contribution of other
4 components. Against this background, we have also already intended to gain information on the toxicological effects
5 induced by chemical variations in air pollution-derived PM_{2.5} samples produced during different seasons in rural-,
6 urban-, or industrial-surroundings (Dergham *et al.* 2012, 2015). Taken together, our results clearly supported that
7 some inorganic, ionic and organic components can act as exogenous source of ROS and the possible role of other
8 factors that remain to be determined (*e.g.*, interaction of PM_{2.5} physical characteristics and cell uptake efficiency, role
9 of other non-investigated chemicals, and/or biological materials). Accordingly, air pollution-derived PM contains a
10 wide variety of organic chemicals including PAH and other related-compounds, which could, directly or indirectly,
11 through their metabolic activation, closely participate to the induction of oxidative and proinflammatory events in
12 human bronchial lung cell models (Boublil *et al.* 2013; Dergham *et al.* 2012, 2015; Longhin *et al.* 2013, 2016; Zhou
13 *et al.* 2014). Other studies, supported that organic extract matter (OEM) can contain a mixture of carcinogenic and/or
14 toxic compounds, have already evaluated their roles in the overall toxicity but failed to clearly decipher the
15 underlying mechanisms (Akhtar *et al.* 2010; Alessandria *et al.* 2014; De Brito *et al.* 2013, Healey *et al.* 2006, Oh *et*
16 *al.* 2011, Xiang *et al.* 2018).

17 In view of the literature supporting the critical role of the organic fraction of air pollution-derived PM_{2.5} in its
18 harmful health effects, further toxicological researches are requested to fill the knowledge about the chemical
19 determinants really involved and their underlying mechanisms of toxicity. The objectives of the present work were
20 also to better investigate the toxicological effects of air pollution-derived OEM collected in Beirut (Lebanon), in an
21 urban surrounding, on human bronchial epithelial lung cells (BEAS-2B). After having collected a representative
22 atmospheric particulate aerosol (PM_{2.5}), and prepared and chemically characterized the derived OEM, we sought to
23 better investigate the underlying mechanisms closely involved in its toxicological effects, with regards to specific
24 endpoints of cytotoxicity, oxidative stress, inflammation, metabolic activation, genotoxicity, and apoptosis.
25

2 - MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

All the culture reagents were from CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability was from Promega (Charbonniere-les-Bains, France). Vybrant Cytotoxicity Assay Kit from Thermo Fisher Scientific (Beirut, Lebanon). Benzo[*a*]Pyrene (B[*a*]P), superoxide dismutase (SOD) determination kit, and other chemical reagents were from Sigma Aldrich (France). TransAM® NRF2 was from from Active Motif (La Hulpe, Belgium). 8-isoprostane (8-Isop) ELISA kit was from Abcam (Paris, France). Highly-sensitive 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) Check was from Gentaur France SARL (Paris, France). Merck-Millipore (Gulf Scientific Corporation Hazmieh - Lebanon and/or St Quentin-en-Yvelines, France) provided MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel- Immunology Multiplex Assay (Cat. No. HCYTOMAG-60K), MILLIPLEX® map 7-plex DNA Damage/Genotoxicity Kit (Cat. No. 48-621MAG), and the 7-Plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit 96-well Plate Assay (Cat. No.48-669MAG). Thermo-Fisher scientific (Beirut - Lebanon and/or Villebon-sur-Yvette- France) provided all the cell culture reagents, FxCycle PI/RNase Staining Solution used for flow cytometric analysis, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Taqman fast advanced master Mix, and Taqman gene expression assays. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit was from QIAGEN (Beirut - Lebanon). Bicinchoninic Acid Assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) was from Thermo Fischer Scientific, United-States).

2.2. Study site description

Atmospheric particulate matter samples were collected in the old airport avenue situated in south Beirut suburb (33° 50' 59" N; 35° 29' 57" E), from the 9th of November 2015 to the 28th of January 2016 (See supplemental material: Figure S1-A, B and C). The sampling site was placed close to one of the busiest area of the city, characterized by huge road traffic, large residential areas, the proximity of three important hospitals, and several commercial centers. 2 km to the study site is located the Rafic Hariri International airport, characterized by an important aerial traffic as is the only airport in Lebanon. Beirut is characterized by a high transport density and this sector is known to be one of the main causes of air pollution in Lebanon, due to the absence of organized public transport resulting in the duplication, each year, of the number of private cars (gasoline engines). Moreover, Beirut also suffers from a major problem that relies on the use of private electric generators diesel powered, in order to fill the gap of the shortage in electricity production supplied by the public sector. The production of electricity in industrial and residential sectors provided by diesel generators is estimated to 500 MW (MOEW, 2010). It is also important to note that Lebanon has suffered from a household waste crisis and wild open burning of waste occurred randomly in Beirut agglomeration during the sampling period.

2.3. PM_{2.5} sampling

PM_{2.5} was sampled using a high-volume cascade sampler TE-231 single (TISCH®, 40 CFM PM_{2.5} single stage), on a daily basis. The first stage was covered with a slotted glass fiber filter (TISCH, TE-230-WH) in order to retain particles with aerodynamic diameter higher than 2.5 µm. After this, impaction stage, a Whatman® cellulose-base filter (230 mm x 254 mm) was used as back-up filter to collect PM with aerodynamic diameter smaller than 2.5 µm (PM_{2.5}). After each sampling period, filters were dried under laminar flow hood during 48 h and then stored at -20°C

1 until further operation. Among the collected filters during the period, 15 samples were selected, for the dry period,
2 for global chemical characterization and for toxicological endpoints. Corresponding wind conditions were mainly
3 from the East pointing to the East residential areas (See supplemental material: Figure S1-C). Wind speed was quite
4 low ($<2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) and would not have favored the dispersion of pollutants during the period.

6 **2.4. Chemical characterization of air pollution-derived PM_{2.5}**

7 PAHs, PolyChloro Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), PolyChloroDibenzoFurans (PCDFs) and
8 PolyChloroBiphenyls (PCBs) quantification was performed by MicroPollutants Technologie S.A. (Saint Julien les
9 Metz, France), using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) for PAHs quantification and high
10 resolution/GC-MS for PCDDs, PCDFs, and PCBs quantification, as published elsewhere (Cazier *et al.* 2016).

12 **2.5. OEM preparation**

13 Toxicological study was focused on the organic fraction of PM_{2.5} (OEM). OEM was prepared using a quarter of
14 each of the 15 filters Pieces of filters were placed in 3 glass tubes (5 pieces per tube) to which 40 mL of
15 dichloromethane was added before ultrasonic treatment for 50 min (100 Watt, 20°C). Then, dichloromethane
16 solutions were gathered, filtered using cellulose acetate filters (Sartorius®, 0.45µm) and slowly evaporated under
17 nitrogen flow in order to obtain a final volume of 5 mL. 1 mL of this solution was dedicated to the organic
18 compounds characterization). Finally, the 4 mL remaining dichloromethane solution was totally evaporated under
19 nitrogen flow and resuspended in 4 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) as described by (Borgie *et al.* 2015a). This
20 DMSO-obtained solution was considered as OEM and used for the toxicological study. A mass of 212.5 mg PM_{0.4-2.5},
21 present on the filters, was used to extract the organic fraction and final concentration of OEM was 42.5 mg PM-
22 equivalent /mL (PM-eq/mL). These concentrations correspond to the OEM extracted from particles and, for
23 toxicological part, BEAS-2B cells were exposed to OEM at their µg PM-eq/cm².

25 **2.6. Toxicity of OEM**

26 **2.6.1. Cell culture and exposure**

27 BEAS-2B cells (ATCC® CRL-9609™, ECACC, Wiltshire, UK) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-
28 Quentin Fallavier, France). This cell line, originally derived from normal human bronchial epithelial cells, was
29 obtained from autopsy of non-cancerous individuals. Cell culture methods have been published elsewhere (Dergham
30 *et al.* 2012, 2015; Leclercq *et al.* 2017b). Briefly, BEAS-2B cells were cultured in 95% humidified air with 5% CO₂
31 at 37°C in 75cm² CellBIND® surface plastic flasks (Corning; Sigma-Aldrich) in LHC-9 medium. Before reaching
32 80% confluence, cells were subcultured by using 0.25% trypsin/0.53mM versene solution containing 0.5% (w/v)
33 polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich). Medium was refreshed every 2-3 days and cells were subcultured weekly
34 (1,500-3,000 cells/cm²). All the BEAS-2B cells we used derived from the same cell culture.

35 Just before reaching confluence ($<80\%$), BEAS cells were exposed to control solution (*i.e.*, LHC-9 with DMSO
36 at 0.025% v/v) or OEM (*i.e.*, concentrations ranging from 0 to 30 µg PM_{2.5}-eq/cm², suspended in LHC-9, with
37 DMSO $< 0.025\%$ v/v). After 6, 24 and/or 72 h, aliquots of cell-free culture media were collected and quickly frozen
38 at -80°C. Adherent cells were washed twice with 1mL-aliquots of cold sterile PBS, and either quickly frozen at -
39 80°C or prepared for flow cytometry analysis. The study of the toxicological endpoints needed the preparation of

1 different cell matrices, as previously described by Leclercq *et al.* (2016, 2017a). Indeed, exposed cells were
2 dedicated to the cytotoxicity test (quantification of adenosine triphosphate (ATP)), for the evaluation of gene
3 expression, generation of oxidative stress, change in cell cycle stages, and genotoxic and apoptotic effects of OEM.
4 Supernatants were dedicated to cytotoxicity tests (quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)) and
5 to proinflammatory cytokine analysis.

7 **2.6.2. Cytotoxicity**

8 Cytotoxicity of OEM was evaluated after cell exposure to increasing concentrations, ranging from 0 to 30 μg
9 $\text{PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$ during 6, 24 or 72 h through the determination of intracellular ATP concentration (CellTiter-Glo®
10 Luminescent Cell Viability, Promega) and extracellular G6PD activity (Vybrant Cytotoxicity Assay Kit, Thermo
11 Fisher Scientific). It should be noted that the concentration of DMSO in the cell culture medium did not exceed
12 0.025% (v/v), which avoided the occurrence of its specific toxicity.

14 **2.6.3. Oxidative stress**

15 Oxidative stress was evaluated firstly by the DNA binding activity of nuclear factor erythroid 2-related factor 2
16 (NRF2) and the associated gene expression of heme oxygenase 1 (*HMOX*) and NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
17 (*NQO1*), secondly by the levels of SOD activity, 8-Isop concentration, and 8-OHdG concentration. NRF2 binding
18 activities were studied using TransAM® NRF2 from Active Motif, according to the manufacturer's
19 recommendations (Leclercq *et al.* 2018). SOD activity was carried out using a commercially available kit (SOD
20 determination kit, Sigma-Aldrich) as described elsewhere (Dieme *et al.* 2012; Garçon *et al.* 2000, 2004; Kouassi *et*
21 *al.* 2010). 8-Isop concentrations were determined using 8-isoprostane ELISA kit from Abcam (Leclercq *et al.* 2016).
22 Oxidative DNA adduct 8-OHdG concentration was studied using a commercially available enzyme immunoassay
23 (Highly Sensitive 8-OHdG Check, Gentaur France SARL), as published elsewhere (Leclercq *et al.* 2017a).

25 **2.6.4. Inflammation**

26 The capacity of OEM to induce the inflammation process was evaluated through the quantification of several
27 proinflammatory cytokines in cell-free culture media using a MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine
28 Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay (Merck-Millipore) following the manufacturer's instructions
29 (Blasco *et al.* 2017). Analytes under study were of tumor necrosis factor ($\text{TNF-}\alpha$), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$),
30 interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and interferon-gamma (IFN-
31 γ).

32 **2.6.5. PAH-metabolizing enzyme gene expression**

33 Gene expression of several genes closely implicated in the PAH metabolic pathway were evaluated
34 (*cytochrome P450 1A1* (*CYP1A1*) and *cytochrome P450 1B1* (*CYP1B1*)), in addition to *aryl hydrocarbon receptor*
35 *nuclear translocator* (*ARNT*) and *aryl hydrocarbon receptor* (*AHR*) genes, using quantitative real-time PCR
36 (TaqMan RT-PCR, Life Technologies, France). Briefly, total RNAs were isolated using the RNeasy Mini Kit
37 (Qiagen). After the reverse transcription of 1 μg of total RNAs in single-stranded cDNAs using the High Capacity
38 cDNA Reverse Transcription Kit, gene expression relative quantitation was carried out using Taqman™ gene
39 expression assays (AhR: Hs00169233_m1, ARNT: Hs01121918_m1, CYP1A1: Hs01054797_m1, CYP1B1:

1 Hs00164383_m1, ARN18S: Hs99999901_s1), a StepOnePlus™ Real-Time PCR System, and the Expression Suite
2 Software (Thermo Fisher Scientific). The relative change in gene expression was calculated by the $\Delta\Delta CT$ method,
3 normalized against endogenous ribosomal 18S.

4 5 **2.6.6. Cell cycle**

6 Determination of DNA content allowed the study of cell populations in various phases of the cell cycle. DNA
7 content can be measured using fluorescent DNA stains that exhibit emission signals proportional to DNA mass. Just
8 after their exposure, BEAS-2B cells were fixed in 70% (v/v) ethanol, washed twice with DPBS, and then
9 resuspended in FxCycle PI/RNase stain for 30 minutes at room temperature. The FxCycle™ PI/RNase Staining
10 Solution, provided as ready-to-use by Thermo-Fisher scientific, was formulated with DNase-free RNase A and a
11 permeabilization reagent in DPBS. Propidium iodide (PI) bind to DNA by intercalating between the bases with little
12 or no sequence preference and with a stoichiometry of one dye per 4-5 base pairs of DNA. Once the dye is bound to
13 nucleic acids, its fluorescence was analyzed using 488 nm excitation, and a 585/42 nm bandpass filter emission by
14 flow cytometry (Attune® Acoustic Focusing Cytometer; Life Technologies, France). The flow cytometric analysis of
15 these stained populations is then used to produce a frequency histogram that reveals the proportion of the cells in
16 each of the different phases of the cell cycle.

17 18 **2.6.7. Genotoxicity and apoptosis**

19 Genotoxic and apoptotic effects of OEM were evaluated by the quantification of proteins involved in these two
20 processes. Briefly, just after their exposure, BEAS-2B cells were collected and centrifuged (10,000 g for 10 minutes
21 at 4°C). Cells were then lysed and samples collected according to the MILLIPLEX® map 7-plex DNA
22 Damage/Genotoxicity Kit (Cat. No. 48-621MAG) and the 7-Plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit 96-well Plate
23 Assay (Cat. No.48-669MAG) protocols, according to the manufacturer's recommendations. Samples were then
24 incubated with gentle rocking at 4 °C for 15 minutes and centrifuged (10,000 g for 10 minutes at 4°C). Protein
25 concentration was determined by bicinchoninic acid assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer
26 Scientific) and then samples were diluted in assay buffer to provide a concentration approximately 20 µg/well.
27 Analyses were then led scrupulously following the manufacturer's instructions. The MILLIPLEX® map 7-plex DNA
28 Damage/Genotoxicity Kit enabled the detection of phosphorylated checkpoint kinase 1 (Chk1), checkpoint kinase 2
29 (Chk2), H2A histone family member X (H2AX) and protein 53 (p53), and total Serine/threonine protein kinase
30 (ATR), mouse double minute 2 homolog (MDM2) and protein 21 (p21) while the 7-Plex Early Apoptosis Magnetic
31 Bead Kit 96-well Plate Assay allowed to detect changes in phosphorylated protein kinase B (AKT) (Ser473), c-Jun
32 N-terminal kinase (JNK) (Thr183/Tyr185), Bcl-2-associated death promoter (BAD) (Ser112), phosphorylated B-cell
33 lymphoma 2 (Bcl-2) (Ser70), and protein 53 (p53) (Ser46), and in active Caspase-8 (Asp384) and active Caspase-9
34 (Asp315) in cell lysates using the MAGPIX analyzer (Merck-Millipore).

35 36 **2.6.8. Statistical analysis**

37 Results are expressed as mean values and standard deviations. For each incubation time, results from BEAS-2B
38 cells exposed to OEM at PM_{2.5}-eq concentrations and B[a]P were compared with those obtained for non-exposed
39 cells. Statistical analyses were performed by the non-parametric Mann-Whitney U-test (Software: SPSS for

1 windows). Mann-Whitney U-test was corrected for multiple comparisons. Statistically significant were reported with
2 $p < 0.05$.

3 **3. RESULTS**

5 **3.1. Chemical characteristics of PM_{2.5}**

6 The mean concentration of the PM_{2.5} was calculated by considering the total mass of particles collected on each
7 filter during the whole sampling period and the total volume of filtered air. This concentration was estimated at 48
8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The 16 PAHs listed by the United States Environmental Protection Agency were quantified and their
9 concentrations are given in Table 1. The total PAH concentration was 9.7 ng/m^3 . Benzo[*b*]fluoranthene, chrysene,
10 benz[*a*]anthracene, pyrene and benzo[*ghi*]perylene were the most abundant with values between 0.99 and 1.52
11 ng/m^3 . Moreover, there were several polychlorinated highly persistent compounds such as PCDDs, PCDFs and DL-
12 PCBs detected in the sampled particles. Total concentrations of PCDDs, PCDFs, and PCBs were about 450 fg/m^3 ,
13 560 fg/m^3 , and 950 fg/m^3 , respectively (Table 2). According to the respective toxicity of the congeners, as defined by
14 Van den Berg *et al.* (2005), their total concentration, as expressed by international toxic equivalent quantity (I-TEQ)
15 was about 58 $\text{fg I-TEQ}/\text{m}^3$ (or 1217 $\text{pg I-TEQ}/\text{g}$).

17 **3.2. OEM Cytotoxicity**

18 As shown in Figure 1, significant decreases of ATP levels were observed in BEAS-2B cells after 72 h of
19 exposure to [OEM] eq PM_{2.5} (5, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$) *versus* control cells (a: $p < 0.05$). Concerning G6PD
20 activity, a significant increase was seen only in BEAS-2B cells 72 h after their exposure to OEM at 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-}$
21 eq/cm^2 *versus* control (b: $p < 0.01$). No significant increases of G6PD activity was induced whatever the exposure
22 times and the B[*a*]P concentrations. Statistically significant decreases in ATP levels were reported only after 72 h of
23 exposure to B[*a*]P from 1 to 100 μM ; B[*a*]P is also a well-known positive control for the induction of different ways
24 of metabolic activation of xenobiotics.

26 **3.3. Oxidative effects of OEM**

27 As shown in Figure 2, statistically significant increases of NRF-2 binding activity were observed in BEAS-2B
28 cells 6 h after their exposure to [OEM] eq PM_{2.5} at 15 and 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and B[*a*]P, and 24 h after their exposure to
29 OEM at 3, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$ and B[*a*]P, in a dose dependent manner ($p < 0.05$). Figure 2 showed also
30 significant induction of both *HMOX* and *NQO1* gene transcription, in BEAS-2B cells, after exposure 6 h to OEM at
31 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$ and B[*a*]P ($p < 0.05$), and after 24 h to OEM at all the tested concentrations, and B[*a*]P ($p < 0.05$).
32 Concerning SOD activity, statistically significant increases activity was observed in BEAS-2B cells 6 h after their
33 exposure to OEM at 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$ and B[*a*]P, on the one hand, and 24 h after their exposure to OEM at 15 and
34 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq}/\text{cm}^2$ and to B[*a*]P, on the other hand ($p < 0.05$). Whatever the incubation times and exposure
35 conditions, statistically significant increases of 8-Isop concentrations were reported in BEAS-2B cells ($p < 0.05$).
36 Moreover, 8-OHdG concentrations increases in a dose-dependent manner after exposure of BEAS-2B cells, 6 and 24
37 h to OEM at all the tested concentrations and to B[*a*]P ($p < 0.05$).

39 **3.4. Inflammatory effects of OEM**

1 As shown in Figure 3, no statistically significant change of the secretion of all the cytokines under study (TNF-
2 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, IFN- γ) were reported in BEAS-2B cells, whatever the exposure conditions and
3 incubation times.

4 5 **3.5. Effects of OEM on gene expression of *AhR*, *ARNT*, *CYP1A1*, and *CYP1B1*,**

6 Whatever the incubation times and the exposure conditions, no statistically significant change of *AhR* and
7 *ARNT* gene expression was observed (Figure 4). In contrast, a statistically significant induction of *CYP1A1* and
8 *CYP1B1* gene transcription was reported in BEAS-2B cells whatever incubation time (6 and 24 h) and exposure
9 conditions (3, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$, or B[a]P (a: $p<0.05$), *versus* control.

10 11 **3.6. Genotoxic effects of OEM**

12 Figure 5 showed statistically significant increases of phosphorylated-P53 concentrations in BEAS-2B cells 72 h
13 after their exposure to OEM at 3 to 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$ ($p<0.05$), and to B[a]P ($p<0.05$). Whatever the incubation
14 times and exposure condition, decreases in phosphorylated-H2AX concentrations, most often statistically significant,
15 were reported in BEAS-2B cells ($p<0.05$). In contrast, no significant change of total MDM-2 and P21 concentrations
16 was observed. Phosphorylated-CHK-1 concentrations statistically increased in BEAS-2B cells 72 h after their
17 exposure to OEM from 3 to 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$ and statistically decreased after exposure to B[a]P ($p<0.05$).
18 Statistically significant increases of phosphorylated CHK-2 concentrations were observed in BEAS-2B cells 72 h
19 after their exposure to OEM at the two highest concentrations and to B[a]P ($p<0.05$).

20 21 **3.7. Effects of OEM on cell cycle (G1, S and G2-M phases) and apoptosis**

22 As shown in Figure 6, no significant change in the percentages of BEAS-2B cells in G₁, S and G₂-M phases
23 were observed in BEAS-2B cells whatever the exposure conditions and incubation times. As well, no significant
24 phosphorylation of JNK was detected in BEAS-2B cells after their exposure to OEM or B[a]P (Figure 7). In contrast,
25 statistically significant increases in phosphorylated AKT concentrations were observed in BEAS-2B cells 24 and 72
26 h after their exposure to OEM at the two highest concentrations and to B[a]P ($p<0.05$) (Figure 7). For almost all the
27 incubation times and exposure conditions, except for 24 h after B[a]P exposure, significant increases of
28 phosphorylated BAD concentrations but not phosphorylated BCL-2 concentrations were reported in BEAS-2B cells
29 ($p<0.05$). The active forms of caspase-8 and 9 were not statistically modified in BEAS-2B cells 24 h or 72 h after
30 their exposure to each of the tested conditions.

31

4. DISCUSSION

Fine particulate matter still constitutes a main air pollution concern due to its well-recognized adverse effects on public health (Gao *et al.* 2015). In this work, fine particulate matter was collected close to one of the busiest area in southern suburb of Beirut (Lebanon). Average concentration of PM_{2.5} was about 48 µg/m³, 1.9 times higher than the daily PM_{2.5} World Human Organization guideline (25 µg/m³, respectively). Nevertheless, this concentration value, a, was in line with previous studies done in Beirut (41 µg/m³) by Borgie *et al.* 2015 but also higher than some other reported values (20 µg/m³) by Massoud *et al.* (2011), and in the suburb (28 µg/m³) by Saliba *et al.* (2010). Other studies show that the average of PM_{2.5} concentrations in Beirut area ranged between 28 and 41 µg/m³ in the period 2003–2007. A lower value, around 20 µg/m³, was reported for the period May 2009 till April 2010, comparing to other cities in the Mediterranean region such as Amman (35 µg/m³), Ahfaz in Iran (70 µg/m³) and Akrotiri and Finokalia in Greece or Erdemli in Southern Turkey, with PM_{2.5} mean levels in the 10–20 µg/m³ (Roumie *et al.* 2011, 2016). Air pollution in Lebanon does not cease to increase last years, as well as occurrence of some chronic lung and cardiovascular diseases related to this type of pollution (Nakhle *et al.* 2015). Aiming to better investigate the critical role of the organic fraction within this fine particulate matter in the triggered harmful health effects, this toxicological research focused a particular attention to the part played by PM_{2.5} OEM. Indeed, the mean total concentration of PAH in the collected fine particulate matter was 9.7 ng/m³. This concentration was higher (8.3 and 28 times, respectively) than those found in 2011 in the Sin El Fil district of Beirut (1.16 ng/m³) and in Bejje (0.35 ng/m³), a rural area located in the north of Lebanon. Benzo[*b*]fluoranthene, the most abundant congener among the PAH family members, mainly reflects the contribution of diesel power generator and diesel trucks and buses as personal cars only runs with gasoline (Borgie *et al.* 2015), The major problems are that the fleet of vehicles in Beirut is generally old and use low quality fuel oil, which is problematic considering the daily density of traffic. Chrysene, the second most abundant PAH, is generally generated during oil distillation process or by waste incinerators (Borgie *et al.* 2015b). In order to better determine the sources of PAH, ratios were calculated referring to Ravindra *et al.* (2008) (Table 3). Diesel exhaust was also incriminated as a PAH contributing source with ratios of indeno[*1,2,3-cd*]pyrene/(indeno[*1,2,3-cd*]pyrene + benzo[*ghi*]perylene) = 0.33 and Benzo[*a*]Pyrene/(Benzo[*a*]Pyrene + Chrysene) = 0.3. These emissions could be related to the use of generators, to compensate the lack of electricity provided by the Lebanese state. In addition, vehicular emission and the use of gasoline engine were also evidenced by Fluoranthene/Pyrene = 0.6 and Pyrene/Benzo[*a*]Pyrene = 2, which were in agreement with the huge road traffic occurring in Beirut and close to the study site. Moreover, reported concentrations of PCDDs (449 fg/m³) and PCDFs (560 fg/m³) were higher (2.1 and 6.5 times, respectively) than those obtained in 2011 in the Sin El Fil district of Beirut: 214 and 87 fg/m³, respectively (Borgie *et al.* 2015 a). The highest concentrations of dioxins and furans found in this study could be related on the recent worrying problem of waste occurring in Lebanon since July 2015, resulting in uncontrolled open waste burning everywhere in the country. Accordingly, it has been considered as the worst solid waste management crisis in the Lebanon history (Baalbaki *et al.* 2016). In 2016, Baalbaki *et al.* (2016) found PCDDs and PCDFs concentrations near an open-air waste burning site in Beirut higher (2.2 and 16,4-fold, respectively) than those measured here. Several studies have shown that PM mass concentration alone might not be able to explain the health outcomes due to its chemically non-specificity. Fine particulate matter contains also a wide variety of chemicals including PAH

1 and other related-compounds that have been rather associated with early oxidative events whereas others been
2 mainly involved in the later oxidative damage and/or proinflammatory mediator secretion in human epithelial
3 bronchial lung cell models (Boublil *et al.* 2013; Longhin *et al.* 2013, 2016; Zhou *et al.* 2014).

4 This study, about the toxicity of PM_{2.5} OEM, was carried out on human bronchial epithelial BEAS-2B cells, a
5 dedicated cell model, mainly due to its relatively high homology to human lung tissues and/or primary cells (Courcot
6 *et al.* 2012). In this work, PM_{2.5} OEM induced dose- and time-dependent ATP concentration decreases and G6PD
7 releases in BEAS-2B cells, thereby triggering late significant changes only 72 h after their exposure to the highest
8 concentrations (*i.e.*, > 5 µg PM_{2.5}-eq/cm² for ATP concentration and 30 µg PM_{2.5}-eq/cm² for G6PD release). These
9 results supported the use of concentrations ranging from 3 to 30 µg PM_{2.5}-eq/cm² for the further study of the other
10 toxicological endpoints at incubation times varying from 6 to 72 h.

11 Among the critical underlying mechanisms of toxicity generally described, generation of ROS, oxidative stress
12 and inflammation are frequently pointed out (Gualtieri *et al.* 2010, 2011). Because of its key role as master regulator
13 of the cell redox homeostasis, NRF-2 is well-equipped to counteract the cytosolic ROS production and is critical for
14 maintaining the redox balance in the cell (Wardyn *et al.* 2015). Following exposure to oxidants or electrophiles,
15 NRF2 accumulates in the nucleus, where it binds to antioxidant response element (ARE) in the upstream regulatory
16 regions of genes encoding NRF-2 targets including antioxidant enzymes, proteins involved in xenobiotic metabolism
17 and clearance, protection against metal toxicity, inhibition of inflammation, repair and removal of damaged proteins,
18 as well as other transcription and growth factors (Suzuki *et al.* 2016). Accordingly, there were dose- and time-
19 dependent significant increases of NRF-2 binding activity to ARE and of some NRF-2 target gene transcription (*i.e.*,
20 *HMOX1* and *NQO1*) or target protein (*i.e.*, SOD) in EOM-exposed BEAS-2B cells. Despite the clear activation of
21 the NRF-2 signaling pathway, somewhat surprisingly, there were also dose- and time-dependent significant lipid
22 peroxidation and DNA oxidative adduct formation. The 8-isoP is a lipid peroxidation product of arachidonic acid and
23 has been identified through coordinated experimental studies led by the National Institute of Environmental Health
24 Sciences as the most useful biomarker of oxidative damage (Erve *et al.* 2017). In DNA, 8-OHdG is considered as
25 one of the predominant forms of free radical-induced oxidative lesions and has therefore been widely used as a
26 biomarker for oxidative stress and carcinogenesis (Valavanidis *et al.* 2009). Taken together, these data closely
27 supported that exposure to PM_{2.5} OEM induced a noticeable cytosolic oxidative stress, thereby activating the NRF-2
28 signaling pathway; however, for the most harmful conditions, the activation of the NRF-2 signaling pathway could
29 not totally counteract the ROS production, thereby leading to oxidative damage to critical macromolecules within
30 BEAS-2B cells (Leclercq *et al.* 2018). Accordingly, Oh *et al.* (2011) confirmed that OEM could induce significant
31 increases of oxidative DNA damage including oxidized purines and pyrimidines. In contrast, Longhin *et al.* (2013)
32 observed that, in BEAS-2B cells, 8-OHdG was increased by whole-PM but not by the corresponding organic extract,
33 suggesting a more direct interaction of some PM components, including both metals and various PAHs, with the
34 DNA. According to the literature, chemical-catalyzed ROS overproduction, notably through the above-reported
35 metabolic activation of PAH and other related compounds, actively contributed to redox imbalance in EOM-exposed
36 BEAS-2B, thereby leading to dramatically damage to critical macromolecules (Boublil *et al.*, 2013; Dergham *et al.*,
37 2012, 2015; Garçon *et al.* 2004; Leclercq *et al.* 2016, 2017a, 2018; Longhin *et al.* 2013; Zhou *et al.*, 2014). It has
38 already been reported that some transcription factors, as such as NRF2, can be activated by electrophilic metabolites
39 obtained following the metabolic activation of PAH by phase I enzymes (*i.e.*, CYP1A1 and 1B1) (Nguyen *et al.*

1 2009). Obtained metabolites will undergo an oxidation catalyzed by the same CYP as before. Quinones thus formed
2 are detoxified by NQO1 to hydroxyquinones. NQO1 therefore ensures a reduction in the amount of intermediate
3 quinones, on the one hand, and semi-quinones, on the other hand. The relatively low level of *NQO1* gene expression
4 in this study, as compared to the high level of *CYP1A1* gene expression, can be explained by the fact that
5 electrophilic metabolites of PAH and other related compounds control the expression of NQO1 via the transcription
6 factor NRF-2, itself, a target gene for the AhR receptor (Brauze *et al.* 2004; Brauze *et al.* 2006; Lawal, 2017).

7 While NRF-2 is an anti-inflammatory, inhibition of inflammation by NRF-2 is generally associated with
8 inhibition of the NF- κ B signaling pathway and inhibition of proinflammatory cytokine production (Fischer *et al.*
9 2015; Ma *et al.* 2013). According to the above-described activation of the NRF-2 signaling pathway, OEM exposure
10 did not trigger any significant change in the secretion of some proinflammatory cytokines (*i.e.*, TNF α , IL-1 β , IL-6,
11 IL-8, MCP-1, and IFN γ) by BEAS-2B cells. However, in the current literature, the proinflammatory effects of PM_{2.5}
12 exposures have already been largely described, thereby highlighting the proinflammatory properties of various types
13 of air pollution-derived PM (Boulbil *et al.* 2013; Ghio *et al.* 2013; Gualtieri *et al.* 2010, 2011; Leclercq *et al.* 2016,
14 2017a, 2017b, 2018; Longhin *et al.* 2013; Loxham *et al.* 2015). There seemed also to be a striking disconnect
15 between the proinflammatory properties of whole PM and their derived EOM, possibly relying on the specific roles
16 played by particles themselves in the induction of some of the underlying mechanisms clearly involved in the
17 production of an inflammatory response (*e.g.*, endocytosis).

18 While the lung is the primary target organ for inhaled pollutants, several enzymatic and non-enzymatic systems
19 cooperate in the metabolic activation of these compounds. Phase I xenobiotic-metabolizing enzymes (XME), in
20 particular cytochromes P450 (CYP), catalyze the first step of xenobiotic processing via oxidation, reduction, or
21 hydrolysis reactions, whereas Phase II XME conjugate xenobiotics or their phase I metabolites to hydrophilic
22 endogenous substrates, making molecules more suitable for elimination (Courcot *et al.* 2012). In general, metabolic
23 activation is beneficial in helping the pulmonary tissues to reduce the potential toxicity of inhaled pollutants.
24 However, sometimes, it transforms harmless substances into electrophile metabolites that are highly reactive towards
25 endogenous macromolecules, thereby producing toxicity (Castell *et al.* 2005). Indeed, the metabolic activation of
26 most of the organic chemicals within PM, and also OEM, usually requires the intervention of phase I XME; among
27 them, CYP1 family enzymes are involved in the conversion of PAH and other related compounds, directly under
28 AhR regulation (Vondracek *et al.* 2011). In this work, according to the relatively high concentrations of PAH and
29 other related compounds found in fine particulate matter, and also derived-OEM, CYP1A1 and I1B1 isoforms,
30 constitutively poorly or not expressed in bronchial tissues, exhibited high transcription levels in BEAS-2B cells,
31 already 6 h until 24 h after their exposure to increasing concentrations of EOM. According to the literature and as
32 shown in this study, OEM are enriched in PAH, PCDD, PCDF and PCB, which can all bind to the AhR receptor,
33 thereby activating the Ah gene battery and in particular its *CYP* genes (*i.e.*, *CYP1A1* and *I1B1*), mainly involved in
34 the formation of carcinogenic diol epoxides (Garçon *et al.* 2004). Accordingly, Gualtieri *et al.* (2011) reported that,
35 due to their relatively high contents of PAH, PM₁₀ and PM_{2.5} collected in a representative of background urban
36 atmospheric pollution during winter season, diesel exhaust particles (SRM 1650a from NIST), and wood smoke were
37 all able to significantly activate the AhR signaling pathway in BEAS-2B cells, after 24h of exposure. Moreover, Oh
38 *et al.* (2011) reported that OEM which contain aliphatic chlorinated hydrocarbons, PAH/their alkyl derivatives, and
39 nitro-AH/ketones/quinones, induced CYP1A1-dependent EROD activity, through AhR pathway activation. In

1 addition, *CYP1A1* and *IBI* gene transcription was increased in BEAS-2B cells 24, 48 and 72 h after their exposure to
2 fine particles (PM_{2.5-0.3}) and OEM derived from quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles, both collected in the agglomeration
3 of Beirut and at a rural site in Lebanon (Borgie *et al.* 2015 a). Indeed, PM_{0.3}-derived OEM, contained high levels of
4 free PAH and other related compounds, also more biologically available in the cell culture medium, thereby allowing
5 them to be absorbed and to efficiently activate the AhR signaling pathway within the target cells. AhR signaling
6 pathway activation, which constitutes one of the important underlying mechanism of toxicity, is specifically related
7 to the critical role of the organic fraction of fine particulate matter.

8 As a possible consequence, when DNA is damaged, it can form double stranded breaks that it is always
9 followed by the phosphorylation of the H2AX histone. The new phosphorylated protein constitutes the first step in
10 recruiting and localizing DNA repair proteins (Kuo *et al.* 2008). Exposure to PM_{2.5} OEM resulted in significant
11 hypo-phosphorylation of H2AX in BEAS-2B cells, thereby indicating an important default in the repair of genetic
12 material. These results can be related to the higher levels of phosphorylated P53, CHK-1 and CHK-2 protein
13 concentrations, on the one hand, and the absence of any changes in MDM-2 protein concentrations, generally closely
14 associated with cell cycle arrest. Accordingly, Oh *et al.* (2011) clearly confirmed that OEM of PM collected in a
15 traffic area have genotoxic effects and that oxidative stress may play a distinct role in the genotoxic effects. The
16 same conclusion was done considering OEM and PM from site under industrial influence in Lebanon (Melki *et al.*
17 2017). The genotoxic effect of these OEM was observed in fractions that may contain aliphatic chlorinated
18 hydrocarbons, PAH/their alkyl derivatives, and nitro-PAH/ketones/quinones, suggesting that these compounds may
19 be important causative agents for the genotoxic effects. Moreover, Gualtieri *et al.* (2011) indicated that the PM_{2.5}
20 exposed BEAS-2B cells resulted in DNA damage, giving DNA-damage response characterized by some increased
21 phosphorylation of ATM, Chk2, but, contrary to our own results, increased phosphorylation of H2AX, with an
22 apparent lack of G2-arrest. In the present study, an increase in phosphorylated AKT concentrations has been reported
23 in BEAS-2B cells exposed to PM_{2.5} OEM. AKT plays an important role in survival pathways by inactivating
24 downstream pro-apoptotic factors in many cell systems (Zhuang *et al.* 2011). Somewhat paradoxically, in this work,
25 an increase of pro-apoptotic BAD protein, despite no change of anti-apoptotic BCL2 protein, has been seen.
26 Increased ratio of BAD/BCL-2 protein concentrations also supported the activation of pro-apoptotic pathway,
27 probably counteracted by the above-described anti-apoptotic pathway. It is noteworthy that both caspase 8 and 9
28 activities were not significantly changed in BEAS-2B after OEM exposure, thereby supporting the absence of clear
29 apoptotic events, in these exposure conditions. Taken together, these results might ask the critical question whether
30 there is a balance or, in contrast, there will rather be an imbalance between the cell survival and the cell death
31 occurring in EOM-exposed BEAS-2B cells, with possible harmful consequences in term of human health effects.
32 Future complementary works are also needed to better decipher the critical role of the organic fraction of fine
33 particulate matter on the cell cycle regulation of target lung cells.

34

1 **5. CONCLUSION**

2
3 In conclusion, PM_{2.5} OEM from southern Beirut suburb was enriched in PAH and other related compounds
4 mainly arising from diesel power generator, diesel vehicle exhaust, and waste burning. Exposure of BEAS-2B cells
5 to the PM_{2.5} EOM showed the ability of PAH and other related compounds to specifically activate both the NRF-2
6 and AhR signaling, contrary to the NF-kB ones. Cell survival and cell death events also occurred in EOM-exposed
7 BEAS-2B cells, with possible harmful consequences in term of cell cycle deregulation. However, more studies are
8 required to implement these reported alterations, thereby contributing to better decipher the critical role of the
9 organic fraction of fine particulate matter on the cell survival or cell death, and to discriminate between the two
10 antagonist phenomena.

1 **ACKNOWLEDGMENTS**

2
3 The research described in this article benefited from grants from the National Council for Scientific Research of
4 Lebanon (Grant Research Program, Ref: 04-06-2014). The “Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le
5 Vivant” (UCEIV-EA4492) and the “IMPacts de l’Environnement Chimique sur la Santé Humaine” (IMPECS-
6 EA4483) both participate in the CLIMIBIO project, which is financially supported by the Hauts-de-France Region
7 Council, the French Ministry of Higher Education and Research, and the European Regional Development Funds.”
8 The authors would like to thank Adam Hachimi from Micropolluants Technologie, for the chemical characterization
9 of air pollution derived PM_{2.5}.

10

1 REFERENCES

- 2
- 3 A.Q.i.E., A. Q. (2016). Technical report, Copenhagen.
- 4 Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., Garçon, G. (2018). Polycyclic aromatic
5 hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. *Environmental*
6 *Chemistry Letters*, 16(2), 439–475.
- 7 Abbas, I., Garçon, G. Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Shirali, P. (2010). Occurrence of
8 molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM_{2.5}.
9 *Chemico-Biological Interactions*, 88(3), 558-565.
- 10 Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Andre, V., Gosset, P., Billet, S., Shirali, P. (2013). Polycyclic aromatic
11 hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human
12 lung cell coculture model. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 109-119.
- 13 Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., & Garçon, G. (2009). Air pollution
14 particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic
15 hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicology in Vitro*, 23(1), 37-46.
- 16 Abbas, I., Verdin, A., Escande, F., Saint-Georges, F., Cazier, F., Mulliez, P., Garçon, G. (2016). In vitro short-term
17 exposure to air pollution PM_{2.5-0.3} induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell
18 co-culture model. *Environmental Research*, 147, 146–158.
- 19 Akhtar, U. S., Mcwhinney, R. D., Rastogi, N., Abbatt, J. P., Evans, G. J., Scott, J. A. (2010). Cytotoxic and
20 proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production
21 of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. *Inhalation Toxicology*, 22, 37–47.
- 22 Alessandria, L., Schiliro, T., Degan, R., Traversi, D., Gilli, G. (2014). Cytotoxic response in human lung epithelial
23 cells and ion characteristics of urban-air particles from Torino, a northern Italian city. *Environmental*
24 *Science and Pollution Research*, 21(8), 5554–5564.
- 25 Baalbaki, R., El Hage, R., Nassar, J., Gerard, J., Saliba, N., Zaarour, R., Saliba, N. (2016). Exposure to atmospheric
26 PMS, PAHS, PCDD/FS and metals near an open air waste burning site in Beirut. *Lebanese Science Journal*,
27 , 91-103(2), 91-103.
- 28 Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., Andre, V., Lafargue, P., Garçon, G. (2008). Genotoxic potential of
29 polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial
30 A549 cells. *Cancer Lett.*, 270, 144–155.
- 31 Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P. (2007).
32 Ambient particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic activation of the
33 organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res.*, 105: 212-223.
- 34 Blasco, H., Garçon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C., Boyer, J., Devos, D., Vourc'h, P., Andres, C.R., Corcia, P.
35 (2017). Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. 44 (1), 90-95
- 36 Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A. C., Martin, P., Courcot, D. (2015 a). Comparison between ultrafine
37 and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and
38 metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution*, 205,
39 250-260.
- 40 Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Dagher, Z. (2015 b). Genotoxic and
41 epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial
42 epithelial cell. *Environmental Research*, 136, 352–362.
- 43 Boubilil, L., Assémat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A. (2013). Development
44 of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of
45 atmospheric particles. *Toxicol in vitro* 27:533-542.
- 46 Brauze, D. (2004). Comparison of the induction of a 4S β naphthoflavone-binding protein, cytochrome P450 1A1
47 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in β- naphthoflavone-treated rats. *Toxicology Letters*, 152, 111–116.
- 48 Brauze, D., Widerak, M., Cwykiel, J., Szyfter, K., & Baer-Dubowska, W. (2006). The effect of aryl hydrocarbon
49 receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat
50 liver. *Toxicol Lett.*, 167(3), 212-220.
- 51 Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., Zhu, T. (2014). Inhalable microorganisms in Beijing's
52 PM_{2.5} and PM₁₀ pollutants during a severe smog event. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 1499-1507.
- 53 Castell, J.V., Donato, M.T., Gomez-Lechon, M.J., Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The *in vitro*
54 cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 2005 ; 57 : 89-204.
- 55 Cazier F., Genevray P., Dewaele D., Nouali H., Verdin A., Ledoux F., Hachimi A., Courcot L., Billet S., Bouhsina
56 S., Shirali P., Garçon G., Courcot D. (2016). Characterisation and seasonal variations of particles in the
57 atmosphere of rural, urban and industrial areas: Organic compounds. *J. Environ. Sci.*, 44, 45-56.
- 58

- 1 Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J.J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shirali, P., Pottier, N., Broly, F., Lo-
2 Guidice, J.M., (2012). Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with
3 in vivo expression profiles. *Drug Metab Dispos.* 40(10):1953-65.
- 4 Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P. (2006). Activation of
5 different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells
6 (L132) in culture. *Toxicology*, 225(1): 12–24.
- 7 Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Shirali, P. (2007). Role of
8 Nuclear Factor-kappa B Activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM_{2.5})
9 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J. Appl. Toxicol.*, 27: 284-290.
- 10 Dagher, Z., Garçon, G., Gosset, P., Ledoux, F., Surpateanu, G., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P.
11 (2005). Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial
12 lung cells (L132) in culture. *J. Appl. Toxicol.*, 25: 166-175.
- 13 De Brito, K., De Lemos, C., Rocha, J., Mielli, A. C., Matzenbacher, C., Vargas, V. (2013). Comparative
14 genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using Salmonella, plants and mammalian cells.
15 *Ecotoxicol Environ Saf.*, 94, 14-20.
- 16 Delfino, R. J., Staimer, N., Tjoa, T., Mohammad, A., Polidori, A., Gillen, D.L., Kleinman, M.T., Schauer, J.J.,
17 Sioutas, C. (2010). Association of Biomarkers of Systemic Inflammation with Organic Components and
18 Source Tracers in Quasi-Ultrafine Particles. 118(6) *Environmental Health Perspectives.* 756-762.
- 19 Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Garçon, G. (2012). Prooxidant and
20 Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) Produced in Rural, Urban, or
21 Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.*, 5(4), 904–
22 919.
- 23 Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Garçon, G. (2015). Temporal–spatial
24 variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and
25 toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environmental Research*, 137, 256-
26 267.
- 27 Dieme, D., Cabral-Ndior, M., Garçon, G., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Diouf, A., Shirali, P. (2012).
28 Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5})
29 collected in Dakar city (Senegal). *Environ Res* 113:1–13.
- 30 Erve, T., Kadiiska, M. L., Masona, R. (2017). Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human
31 diseases: A meta-analysis. *Redox Biology*, 12, 582-599.
- 32 Fischer, B.M., Voynow, J.A., Ghio, A.J., (2015). COPD: balancing oxidants and antioxidants, *Int. J COPD*, 10:261-
33 276
- 34 Gao, M., Guttikunda, S. K., Carmichael, G. R., Wang, Y., Liu, Z., Stanier, C. O., Yu, M. (2015). Health impacts and
35 economic losses assessment of the 2013 severe haze event in Beijing area, . *Sci. Total Environ.*, 511, 553–
36 561.
- 37 Garçon, G., Dagher, Z., Zerimech, F., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., Puskaric, E., Shirali, P. (2006).
38 Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in
39 human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol. In Vitro*, 20: 519-528.
- 40 Garçon, G., Gosset, P., Zerimech, F., Grave-Descampiaux, B., Shirali, P. (2004). Effect of Fe₂O₃ on the capacity of
41 benzo(a)pyrene to induce polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in the respiratory tract of
42 Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.*, 150 (2): 179-189.
- 43 Garçon G., Shirali, P. Garry, S., Fontaine, M., Zerimech, F., Martin, A., Hannotiaux, M.H., (2000). Polycyclic
44 aromatic hydrocarbon coated onto Fe₂O₃ particles: assessment of cellular membrane damage and
45 antioxidant system disruption in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology Letters*, 117(1–2),
46 25-35.
- 47 Ghio, A.J., Dailey, L.A., Soukup, J.M., Stonehuerner, J., Richards, J.H., Devlin, R.B. (2013). Growth of human
48 bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Part Fibre*
49 *Toxicol*, 10:25.
- 50 Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E., Camatini, M. (2010).
51 Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial
52 lung cells, *Toxicol In Vitro*. 24:29-39.
- 53 Gualtieri, M., Øvrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.J., Camatini, M., Holme, J.A. (2011).
54 Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2.5}) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA
55 mitochondria AhR binding and spindle organization. *Mutat Res* 713:18-31.
- 56 Healey, K., Smith, E. C., Wild, C. P., Routledge, M. N. (2006). The mutagenicity of urban particulate matter in an
57 enzyme free system is associated with the generation of reactive oxygen species. *Mutation*
58 *Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 602(1–2), 1-6.

- 1 Kim, B. M., Lee, S.-B., Kim, J. Y., Seo, J., Bae, G.-N., Lee, J. Y. (2016). A multivariate receptor modeling study of
2 air-borne particulate PAHs: Regional contributions in a roadside environment. *Chemosphere*, 144, 1270–
3 1279.
- 4 Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P., (2010).
5 Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter
6 (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J Appl Toxicol*. 30(4):310-20.
- 7 Kuo, L. Y. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22(3), 305-309.
- 8 Lawal, A.O. (2017). Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and
9 atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicol Lett.*, 15;270:88-95.
- 10 Leclercq, B., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Riffault, V., Hapillon, M., Strecker, A., Lo Guidice J.M., Garçon, G.,
11 Coddeville, P. (2017b). Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media:
12 Toxicological perspectives? *Env Res*, 156:148-157.
- 13 Leclercq, B., Hapillon, M., Antherieu, S., Hardy, E.,M., Alleman, L.,Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B.,M.,
14 Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., Garçon, G. (2016). Differential responses of healthy and chronic
15 obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived
16 PM₄. *Env. Poll.* 218:1074-1088.
- 17 Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice,
18 J.M., Marchetti, P., Garçon, G. (2018). Air pollution-derived PM_(2,5) impairs mitochondrial function in
19 healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environ Pollut.*
20 25;243(PtB):1434-1449.
- 21 Leclercq, B., Platel, A., Antherieu, S., Alleman, L.Y., Hardy, E.M., Perdrix, E., Grova, N., Riffault, V., Appenzeller,
22 B.M., Hapillon, M., Neslany, F., Coddeville, P., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2017a). Genetic and
23 epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly
24 exposed to air pollution-derived PM_{2.5}. *Env. Poll.* 230:163-177
- 25 Liu, S., Cai, S., Chen, Y., Xiao, B., Chen, P., Xiang, X. D. (2016). The effect of pollutional haze on pulmonary
26 function. *J. Thorac. Dis.*, 8(1), 41-56.
- 27 Longhin, E., Gualtieri, M., Capasso, L., Bengalli, R., Mollerup, S., Holme, J.A., Øvrevik, J., Casadei, S., Di
28 Benedetto, C., Parenti, P., Camatini, M. (2016). Physico-chemical properties and biological effects of
29 diesel and biomass particles. *Environ Pollut.* 215:366-375.
- 30 Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., Gualtieri, M. (2013). Season
31 linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol. in vitro*, 27:551-559.
- 32 Lonkar, P., Dedon, P.C. (2011). Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical
33 mechanisms and biological fates. *Int J Cancer*. 128(9):1999-2009.
- 34 Loomis, D., Huang, W., Chen, G. (2013). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of
35 the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese Journal of Cancer*, 33(4), 189-196.
- 36 Loxham, M., Morgan-Walsh, R.J., Cooper, M.J., Blume, C., Swindle, R.J., Dennison, P.W., Howarth, P.H., Cassee,
37 F.R., Teagle, D.A.H., Palmer, M.R., Davies, D.E. (2015). The effects on bronchial epithelial mucociliary
38 cultures of coarse fine and ultrafine particulate matter from an underground railway station. *Toxicol, Sci*
39 145(1):98-107.
- 40 Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 53, 401-426.
- 41 Massoud, R., Shihadeh, A., Roumie, M., Youness, M., Gerard, J., Saliba, N., Saliba, N. (2011). Intraurban variability
42 of PM₁₀ and PM_{2.5} in an Eastern Mediterranean city. *Atmos. Res.*, 101, 893-901.
- 43 Melki, P.N., Ledoux, F., Aouad, S., Billet, S., El Khoury, B., Landkocz, Y., Abdel-Massih, R.M., Courcot D. (2017).
44 Physicochemical characteristics, mutagenicity, and genotoxicity of airborne particles under industrial and
45 rural influences in Northern Lebanon. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 18782-18797.
- 46 MOEW. (2010). Policy Paper for the electricity sector, *H.E Gebran Bassil Ministry of Energy and Water*.
- 47 Nakhle, M.M., Farah, W., Ziade, N., Abboud, M., Coussa-Koniski, M.L., Annesi-Maesano, I. (2015). Beirut Air
48 Pollution and Health Effects - BAPHE study protocol and objectives. *Multidiscip Respir Med.* 10(1): 21.
- 49 Nguyen, P.M., Park, M.S., Chow, M., Chang, J.H., Wrischnik, L., Chan, W.K., (2010). Benzo[a]pyrene increases the
50 Nrf2 content by downregulating the Keap1 message. *Toxicol. Sci.* 116, 549–561.
- 51 Oh, M., Kim, H. R., Park, Y. J., Chung, K. H. (2011). Organic extracts of urban air pollution particulate matter
52 (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells).
53 *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 723(2), 142–151.
- 54 Perrone, M. G., Gualtieri, M., Ferrero, L., Lo Porto, C., Udisti, R., Bolzacchini, E., Camatini, M., (2010). "Seasonal
55 variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan." *Chemosphere*
56 78(11): 1368-1377.
- 57 Perrone, M.G., Gualtieri, M., Consonni, V., Ferrero, L., Sangiorgi, G., Longhin, E., Ballabio, D., Bolzacchini, E.,
58 Camatini, M. (2013). Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or remote site

- 1 origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary cells. *Environ Pollut.*,
2 176:215-27.
- 3 Pui, D., Chen, S. C., Zuo, Z. (2014). PM_{2.5} in China: Measurements, sources, visibility and health effects, and
4 mitigation. *Particuology*, 13, 1-26.
- 5 Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution,
6 emission factors and regulation. *Atmos. Environ.*, 42, 2895–2921.
- 7 Roumie, M., Chiari, M., Srour, A., Sa'adeh, H., A., Reslan, Sultan, M., Ahmad, M., Calzolari, G., Nava, S.; Zubaidi,
8 Th., Rihawy, M.S., Hussein, T., Arafah, D.-E., Karydas, A.G., Simon, A., Nsoul, B. (2016). Evaluation and
9 mapping of PM_{2.5} atmospheric aerosols in Arasia region using PIXE and gravimetric measurements.
10 *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 371, 381–386.
- 11 Roumie, M., Saliba, N., Nsouli, B.; Younes, M., Noun, M., Massoud, R., (2011). PIXE Identification of Fine and
12 Coarse Particles of Aerosol Samples and their distribution across Beirut". *Nucl. Instr. Meth. B*. 269, 3106-
13 3110.
- 14 Saint-Georges, F, Garçon, G, Escande, F, Abbas, I, Verdin, A, Gosset, P, Mulliez, P, Shirali, P. (2009). Role of air
15 pollution particulate matter (PM_{2.5}) in the occurrence of loss of heterozygosity in multiple critical regions of
16 3p chromosome in human epithelial lung cells (L132). *Toxicol. Lett.* 187: 172–179.
- 17 Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Garçon, G. (2008). Gene expression
18 induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in
19 isolated human alveolar macrophages in response to air-borne particulate matter (PM_{2.5}). *Toxicology*, 244,
20 220–230.
- 21 Saliba, N., El jam, F., El tayar, G., Obeid, W., Roumie, M. (2010). Origin and variability of particulate matter (PM₁₀
22 and PM_{2.5}) mass concentrations over an Eastern Mediterranean city. 97, 106-114.
- 23 Suzuki, M., Otsuki, A., Keleku-Lukwete, N., Yamamoto, M. (2016). Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2
24 system in toxicology and cancer. *Curr Opinion Toxicol.* 1:29-36.
- 25 US-EPA (2016); Revised air quality standards for particle pollution and updates to the air quality index (AQI).
- 26 Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical
27 biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol*
28 *Rev.*, 27(2), 120-139.
- 29 Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H.,
30 Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M.,
31 Walker N., Peterson R.E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and
32 Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological sciences: an*
33 *official journal of the Society of Toxicology*, 93, 223-241
- 34 Van Winkle, L. S., Bein, K., Anderson, D., Pinkerton, K. E., Tablin, F., Wilson, D., Wexler, A. S. (2015). Biological
35 dose response to PM_{2.5}: effect of particle extraction method on platelet and lung responses. *Toxicol. Sci.*,
36 143, 349-359.
- 37 Vondráček, J., Umannová, L., Machala, M. (2011). Interactions of the Aryl Hydrocarbon Receptor with
38 Inflammatory Mediators: Beyond CYP1A Regulation, *Current Drug Metabolism*, 12, 89-103.
- 39 Wardyn, J.D., Ponsford, A.H., Sanderson, C.M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB
40 response pathways. *Biochem, Soc, Trans.* 43:621-626.
- 41 Weber, S. A., Insaf, T. Z., Hall, E. S., Talblot, T. O., Huff, A. K. (2016). Assessing the impact of fine particulate
42 matter (PM_{2.5}) on respiratory-cardiovascular chronic diseases in the New York City Metropolitan area using
43 Hierarchical Bayesian Model estimates. *Environmental Research*, 151, 399–409.
- 44 WHO (2015) WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. WHO
45 Air quality guidelines.
- 46 Xiang, P., He, R., Liu, R., Li, K., Gao, P., Cui, X., Li, H.; Liu, Y.; Ma, L.Q. (2018). Cellular responses of normal
47 (HL-7702) and cancerous (HepG2) hepatic cells to dust extract exposure. *Chemosphere (2018) 1189e1197*,
48 193, 1189-1197.
- 49 Xing, Y., Xu, Y., Shi, M., Lian, Y. (2016). The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system. *J. Thoracic Dis.*,
50 8, 69-74.
- 51 Zhou, B., Liang, G., Qin, H., Peng, X., Huang, J., Li, Q., Qing, L., Zhang, L., Chen, L., Ye, L., Niu, P., Zou, Y.
52 (2014). p53-Dependent apoptosis induced in human bronchial epithelial (16-HBE) cells by PM_(2.5) sampled
53 from air in Guangzhou, China. *Toxicol Mech Methods.* 24(8):552-9.
- 54 Zhuang, Z., Zhao, X., Wu, Y., Huang, R., Zhu, L., Zhang, Y., Shi, J. (2011). The anti-apoptotic effect of PI3K-Akt
55 signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Ann Clin Lab Sci. Fall;41(4):364-72.*, 41(4), 364-
56 372.
- 57
58

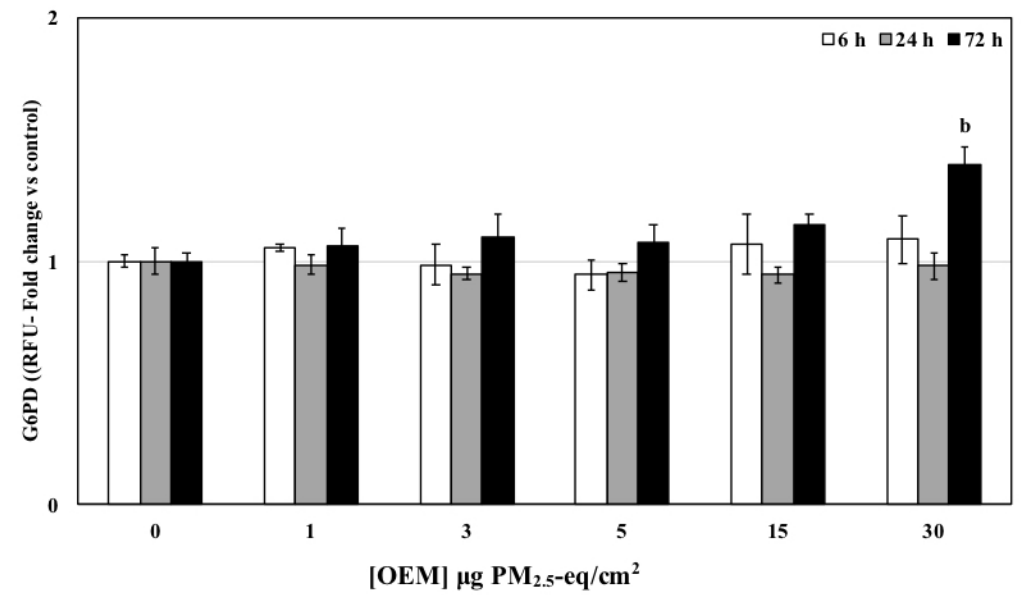
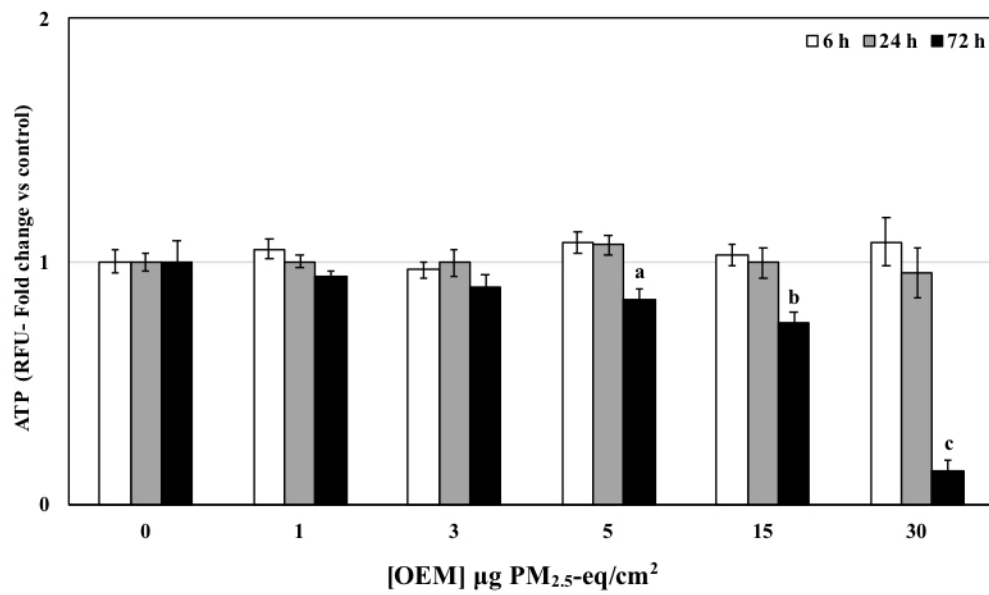


Figure 1: Adenosine triphosphate (ATP) and Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activities in BEAS-2B cells, normalized to control, exposed 6, 24 and 72 h to increasing concentrations of organic extract matter [OEM] (1, 3, 5, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$). Results are described by their means and their standard deviations (6 replicates for controls, and 8 replicates for exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$).

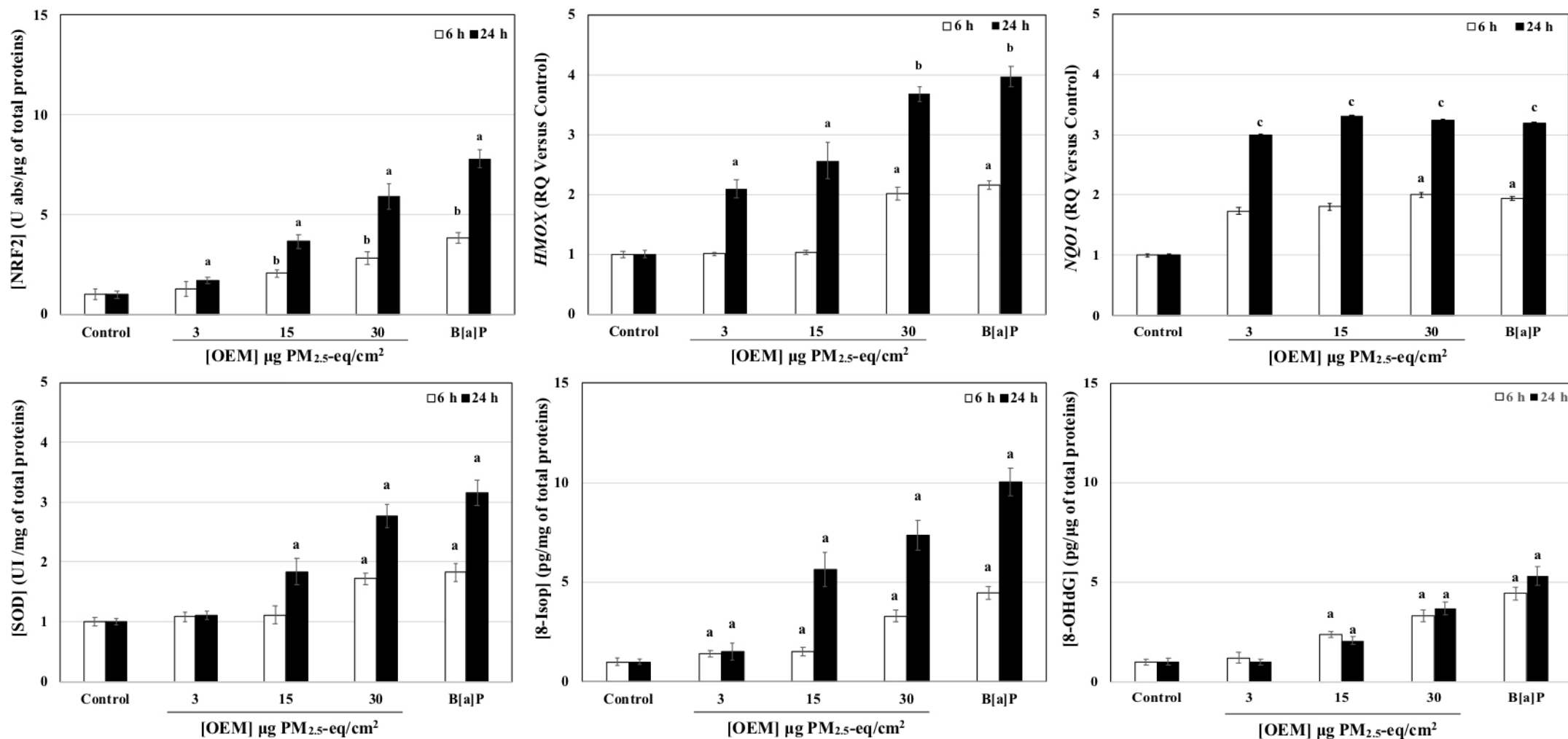


Figure 2: Oxidative response: gene or protein expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2), heme oxygenase 1 (HMOX), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), Superoxide dismutase (SOD), 8-Isoprostane (8-Isop) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to organic extract matter [OEM] (3, 15 and 30 µg PM_{2.5}-eq/cm²) and B[a]P (25 µM). Results are described by their means and their standard deviations (6 replicates for controls, and 6 replicates for exposed cells (Mann-Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$).

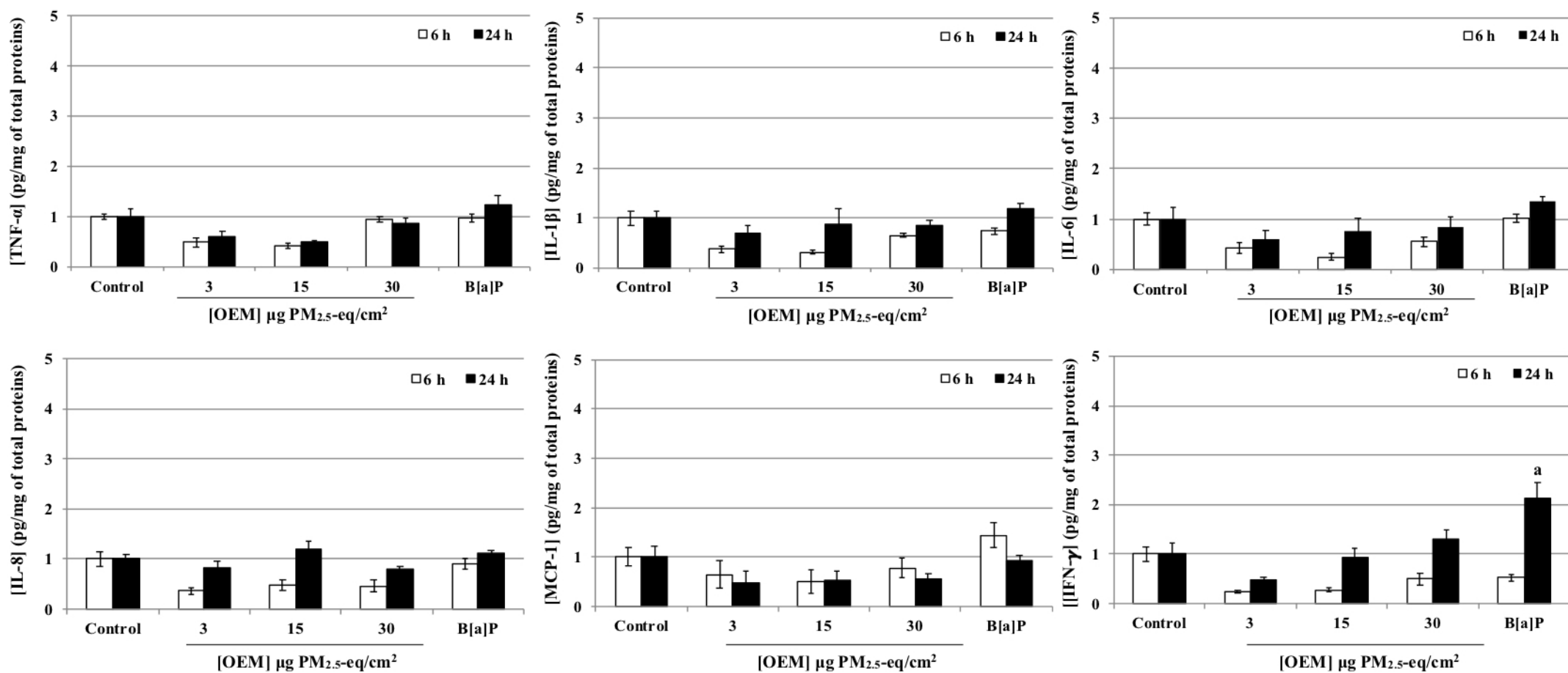


Figure 3: Inflammation: protein expression of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and interferon-gamma (IFN- γ), in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to organic extract matter [OEM] (3, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$) and B[a]P (25 μM). Results are described by their means and their standard deviations (6 replicates for controls and 6 replicates for exposed cells (Mann-Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$).

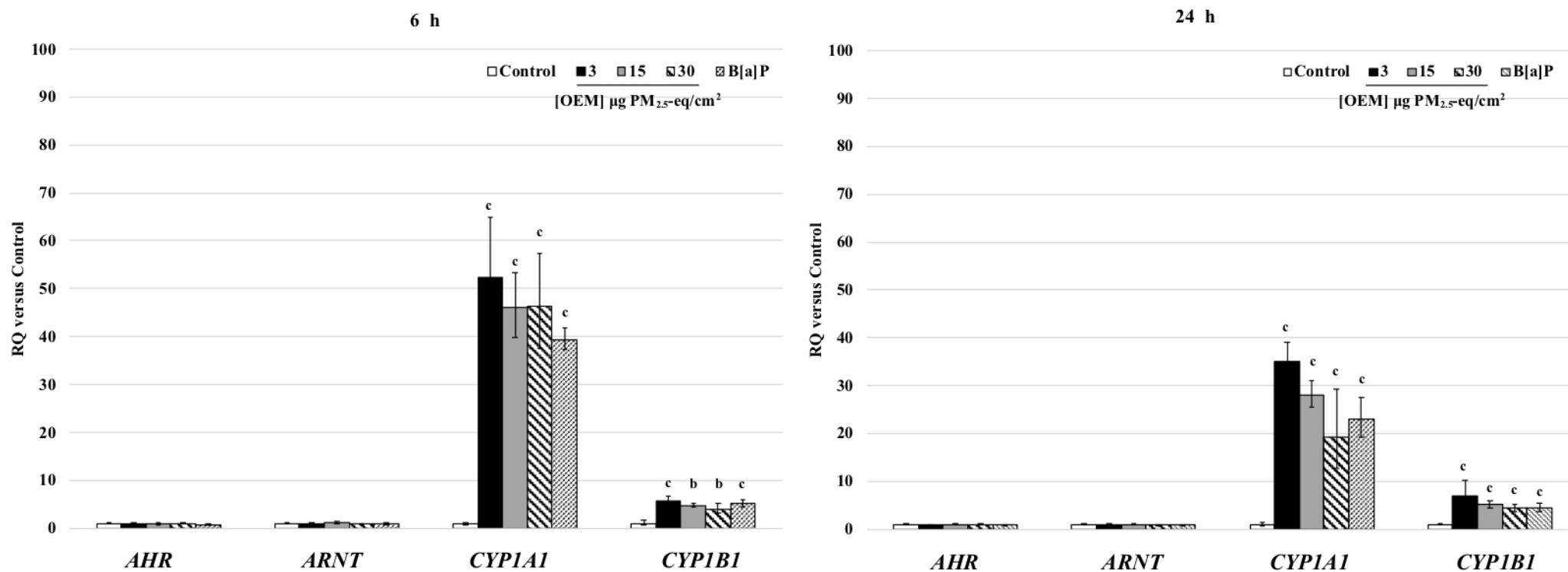


Figure 4: Metabolic activation: gene expression of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), aryl hydrocarbon receptor (AHR), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) enzymes in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to organic extract matter [OEM] (3, 15 and 30 $\mu\text{g PM}_{2.5}\text{-eq/cm}^2$) and B[a]P (25 μM). These values are depicted as mean values and ranges (minimum value–maximum value) of 6 replicates for controls and 6 replicates for exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$).

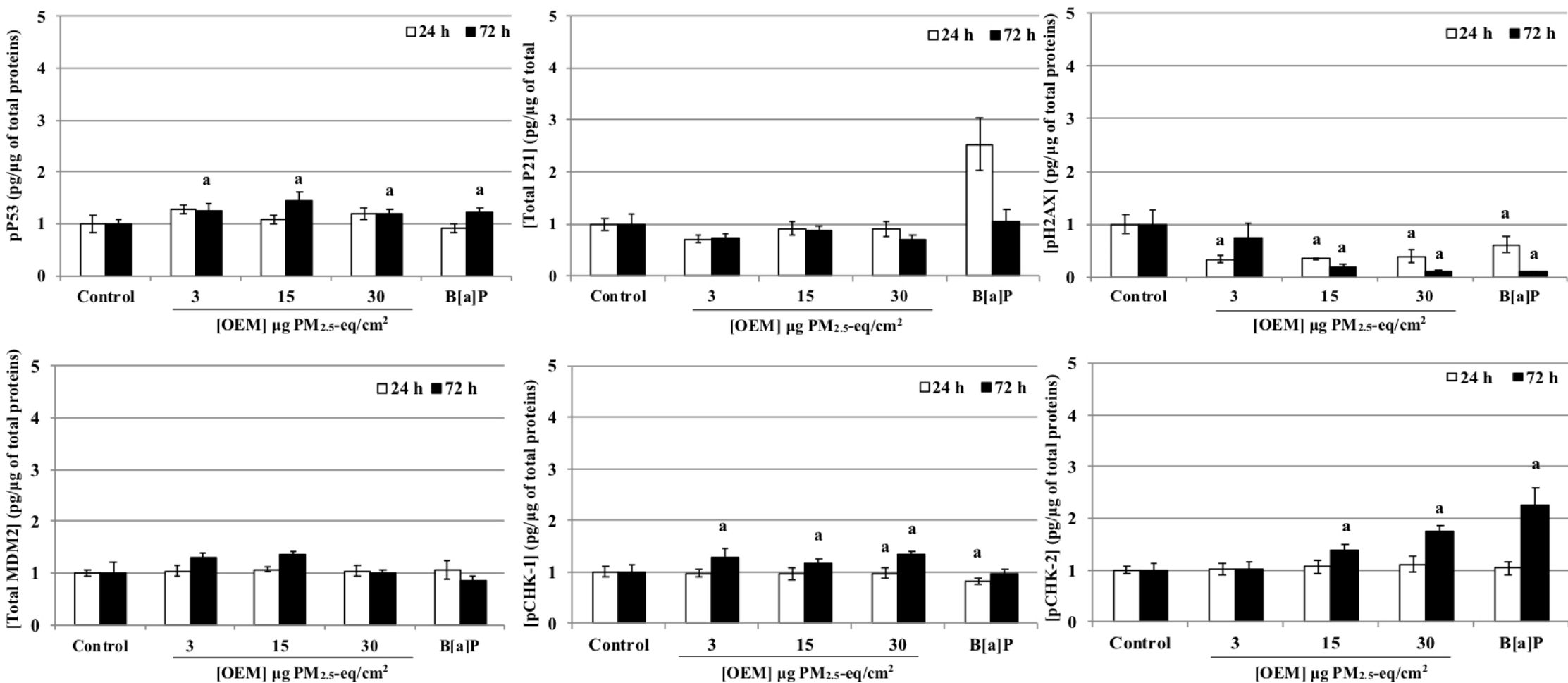


Figure 5: Genotoxicity: protein expression of phosphorylated protein 53 (pP53), total protein 21 (P21), phosphorylated H2A histone family member X (H2AX), total mouse double minute 2 homolog (MDM-2), phosphorylated checkpoint kinase 1 (CHK-1), and phosphorylated checkpoint kinase 2 (CHK-2) in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to organic extract matter [OEM] (3, 15 and 30 μg PM_{2.5}-eq/cm²) and B[a]P (25 μM). These values are described by their means and their standard deviations of 6 replicates for controls and 6 replicates for exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. controls; a = *p* < 0.05).

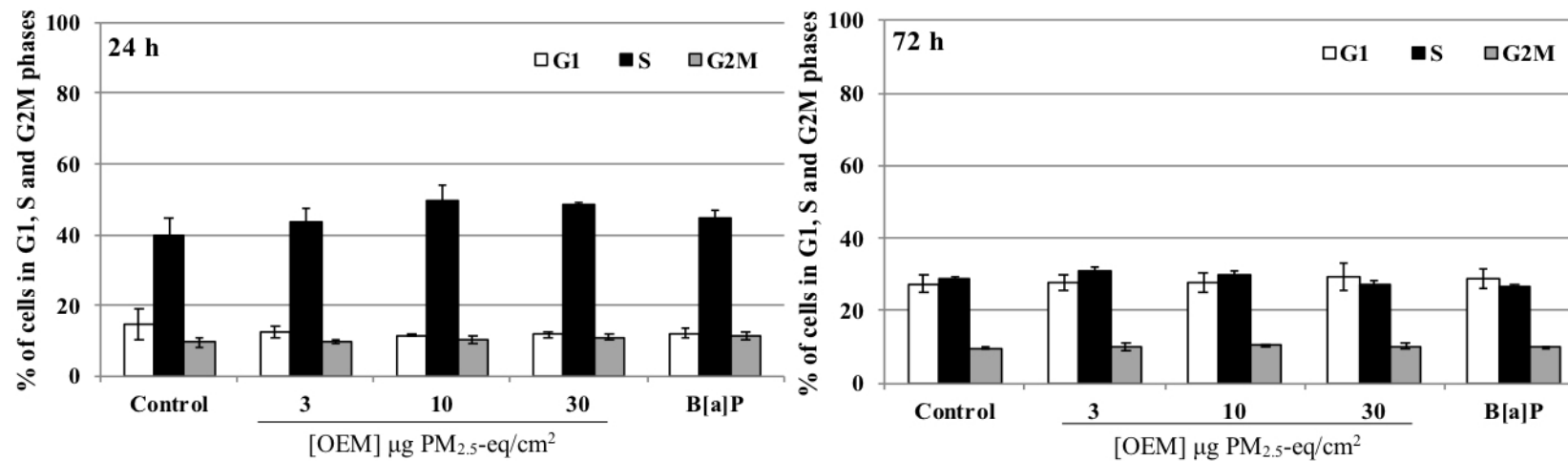


Figure 6: Cell cycle: Percentage of BEAS-2B cells in G1, S, and G2M phases 24 and 72 h after exposure to organic extract matter (3, 15 and 30 µg PM_{2.5}-eq/cm²) and B[a]P (25 µM). These values are described by their means and their standard deviations of 6 replicates for controls and 6 replicates exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$).

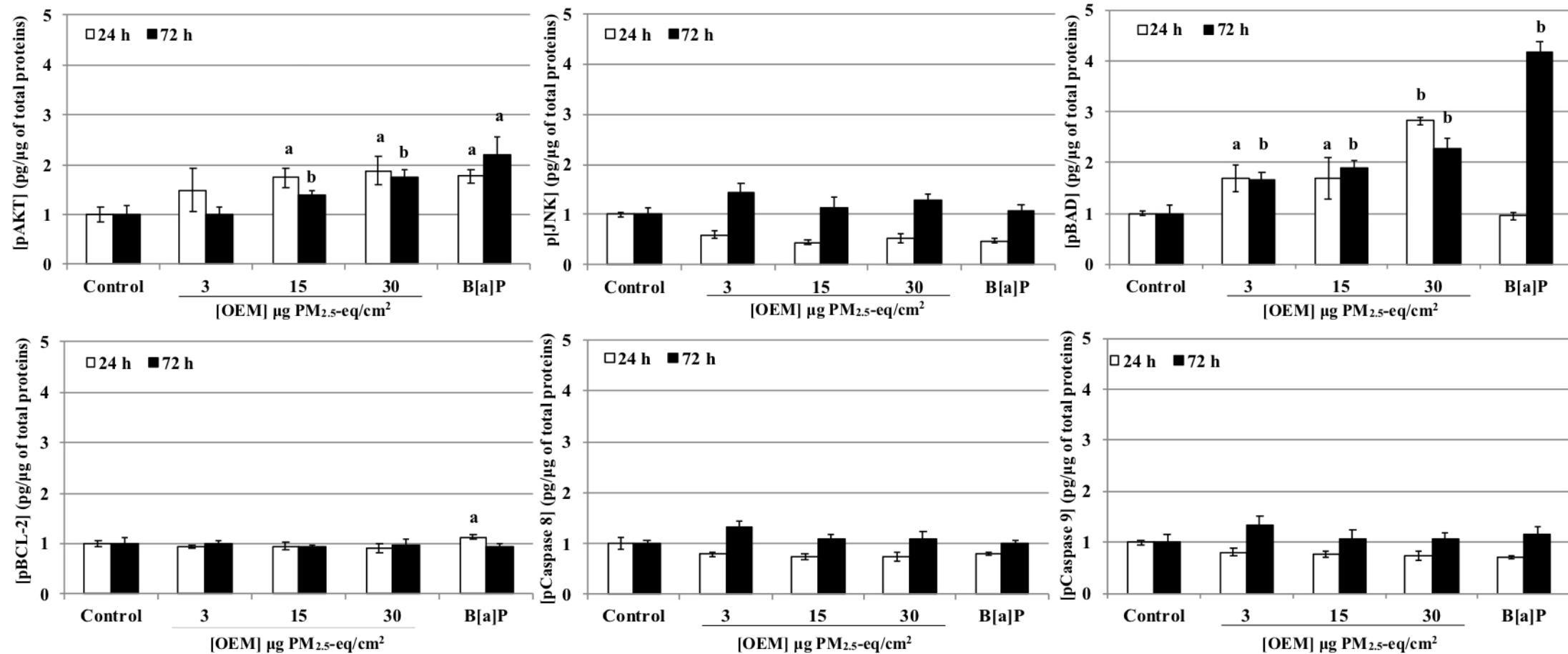


Figure 7: Apoptosis: protein expression of phosphorylated protein kinase B (AKT), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphorylated Bcl-2-associated death promoter (BAD), phosphorylated B-cell lymphoma 2 (BCL-2), and phosphorylated Caspase-8 and 9, in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to organic extract matter [OEM] (3, 15 and 30 μg PM_{2.5}-eq/cm²) and B[a]P (25 μM). These values are described by their means and their standard deviations of 6 replicates for controls and 6 replicates for [OEM] eq PM_{2.5} and B[a]P (Mann–Whitney U-test; vs. controls; a = $p < 0.05$, b = $p < 0.01$, c = $p < 0.001$).

Table 1: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) concentrations in PM_{2.5} collected in the old airport avenue situated in south Beirut suburb.

	Concentration (µg/g)	Concentration (pg/m ³)
Naphthalene (NAP)	2.7	131
Acenaphthylene (ACY)	4.5	218
Acenaphthene (ACE)	2.3	112
Fluorene (FLU)	<0.2	<11
Phenanthrene (PHE)	9.6	458
Anthracene (ANT)	2.8	134
Fluoranthene (FLT)	15.4	736
Pyrene (PYR)	25.9	1243
Benz[a]anthracene (B[a]A)	25.7	1231
Chrysene (CHR)	28.8	1379
Benzo[b]fluoranthene (B[b]F)	31.7	1519
Benzo[k]fluoranthene (B[k]F)	8.2	394
Benzo[a]pyrene (B[a]P)	12.9	618
Dibenz[ah]anthracene (D[ah]A)	<0.2	<11
Indeno[123cd]pyrene (I[cd]P)	10.3	495
Benzo[ghi]perylene (B[ghi]P)	20.6	989
Total PAHs	202	9655

Table 2: PolyChloro Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), PolyChloroDibenzoFurans (PCDFs) and PolyChloroBiphenyls (PCBs) concentration in PM_{2.5} collected in the old airport avenue situated in south Beirut suburb

	Concentration (pg/g)	Concentration (fg/m³)
2,3,7,8 TCDD	39	2
1,2,3,7,8 PeCDD	184	9
1,2,3,4,7,8 HxCDD	220	11
1,2,3,6,7,8 HxCDD	480	23
1,2,3,7,8,9 HxCDD	380	18
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	3170	152
OCDD	5114	245
Total PCDD	9587	459
2,3,7,8 TCDF	401	20
1,2,3,7,8 PeCDF	431	20
2,3,4,7,8 PeCDF	919	40
1,2,3,4,7,8 HxCDF	1076	50
1,2,3,6,7,8 HxCDF	983	50
2,3,4,6,7,8 HxCDF	1341	50
1,2,3,7,8,9 HxCDF	304	10
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	3933	200
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	477	20
OCDF	2390	100
Total PCDF	12255	560
PCB81	214	10
PCB77	791	38
PCB123	156	7
PCB118	7330	351
PCB114	156	7
PCB105	4213	202
PCB126	483	23
PCB167	2124	102
PCB156	2573	123
PCB157	317	15
PCB169	279	13
PCB189	1182	57
Total DL-PCB	19818	949

Table 3: PAHs ratios used as source indicators

Diagnosis Ratio	(Ravindra, et al., 2008)		Current Study
	Value	Sources	
InPy/(InPy+ B[g,h,i]P)	0.18 0.37 0.56 0.62 0.35-0.70	Gasoline Diesel Coal Wood burning Diesel emissions	0.33
B[a]P/(B[a]P + Chr)	0.5 0.73	Diesel Gasoline	0.3
B[b]Fl/B[k]Fl	<0.5	Diesel	3.8
B[a]P/B[g,h,i]P	0.5-0.6 >1.25	Traffic emission Brown coal	0.6
Pyr/B[a]P	≈10 ≈1	Diesel Engine Gasoline engine	2
Fla/Pyr	0.6	Vehicular emissions	0.6

(Ravindra *et al.* 2008, Borgie *et al.* 2015 a)

B[a]P: benzo[a]Pyrene; B[b]Fl: benzo[b]fluoranthene; B[ghi]P: benzo[ghi]perylene; B[k]Fl: benzo[k]fluoranthene; Chr: chrysene; Fla: fluoranthene; Flu: fluorene; InPy:indeno[1,2,3-*cd*]pyrene; Pyr: pyrene.

III. Article 2

Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions.

Publié dans « Chemosphere »

doi : 10.1016/j.chemosphere.2019-125440

L'objectif de cette étude vise à évaluer le rôle crucial des composants chimiques liés à des différentes fractions granulométriques des PM, à des fractions extractibles ou encore à des fractions non extractibles étroitement impliquées dans la toxicité des particules.

Dans ce contexte, des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) ont été échantillonnées au niveau d'un site urbain à Beyrouth, Liban par impaction en cascade entre le 1^{er} Janvier et le 3 Mars 2017. Ces échantillons ont été caractérisés (éléments traces, majeurs et ions hydrosolubles, HAPs, n et o-HAPs, PCBs, dioxines et furanes). Une extraction de la fraction organique des $PM_{2.5-0.3}$ et des $PM_{0.3}$, par du dichlorométhane, a été réalisée par traitement par des ultrasons aboutissant à l'obtention de deux extraits organiques $EOM_{2.5-0.3}$ et $EOM_{0.3}$, respectivement. Nous avons également considéré la fraction non extractible des $PM_{2.5-0.3}$ ($NEM_{2.5-0.3}$). La préparation de la fraction non extractible des $PM_{0.3}$ n'a pas été possible en raison de l'impaction des $PM_{0.3}$ sur des filtres, contrairement au $PM_{2.5-0.3}$.

L'évaluation des effets toxiques des différents échantillons a été menée par une étude de la cytotoxicité globale, de la voie de l'activation métabolique des composés organiques, ainsi que la capacité des différents échantillons à induire une génotoxicité. La

Figure 40 décrit les différentes démarches appliquées dans cette étude.

La concentration moyenne des $PM_{2.5}$ au cours de la période d'échantillonnage était de $54 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Le dosage des éléments majeurs et traces, ainsi que des ions hydrosolubles a montré la présence des éléments Al, Ca, Fe, Mg, Ca et Ti, qui peuvent être liés à la resuspension des poussières du sol. Les ions majoritairement détectés étaient le NO_3^- et le SO_4^{2-} résultant principalement de la conversion des gaz NO_x et SO_2 . De plus, la concentration du carbone total était 7 fois plus importante dans les $PM_{0.3}$ que dans les $PM_{2.5-0.3}$ (126 vs 17,5 mg/g). Cette concentration plus élevée dans les particules quasi ultrafines peut être liée à la contribution de suies connues pour appartenir à cette fraction granulométrique. Ceci peut être relié aux émissions du trafic routier dense à proximité du site d'échantillonnage. Le dosage de la fraction organique a montré que la concentration des HAPs, N-HAPs, O-HAPs était respectivement 43, 17 et 4 fois plus importante dans les particules quasi-ultrafines que dans les particules fines, en lien avec une influence prédominante des activités anthropiques et des sources de combustion.

L'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$ et $EOM_{0.3}$, pendant 6 et 24 heures, à deux concentrations (3 et $12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a montré un profil d'expression différent des gènes impliqués dans la voie de métabolisation des composés organiques (*AHR*, *AhRR*, *ARNT*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EPHX-1*, *GSTA-4*). Les $PM_{2.5-0.3}$ considérées dans leur entièreté ont induit

l'expression de l'AHR, AHRR, ARNT, CYP1A1, CYP1B1 et GSTA-4 après 6 et 24 heures d'exposition aux deux doses. Par contre, l'extrait organique de ces particules (EOM_{2.5-0.3}), a uniquement induit l'expression du CYP1A1 et CYP1B1 6 heures après exposition et ceci à la plus forte dose.

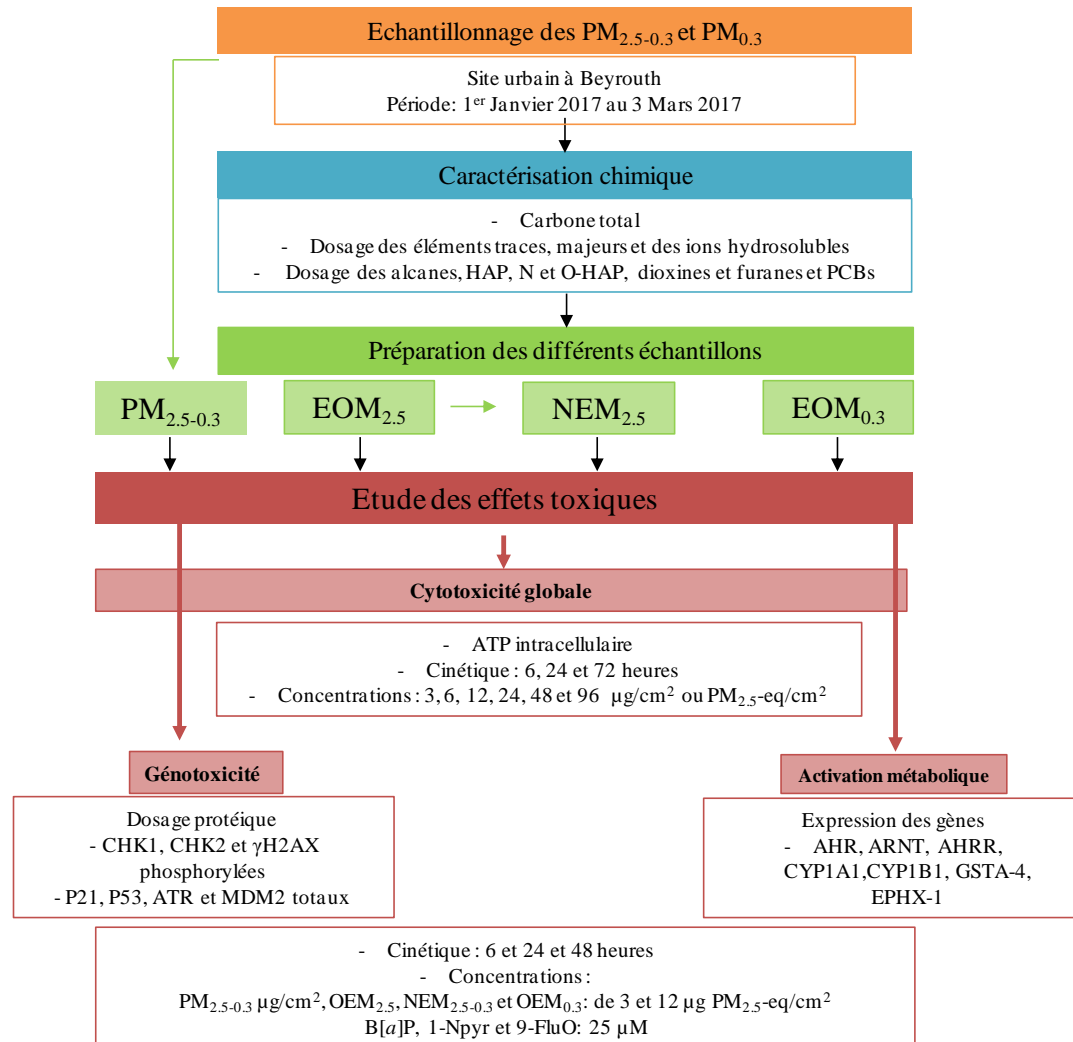


Figure 40 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.

Une hypothèse expliquant ces différentes réponses entre ces deux échantillons peut être suggérée. La composition de la fraction organique est identique pour les deux échantillons OEM_{2.5-0.3} et PM_{2.5-0.3}. Dans le premier cas, les composés organiques sont présents sans interaction avec le support particulaire alors que pour le second échantillon, ceux-ci sont liés à la matrice particulaire. La différence entre les résultats obtenus pour ces deux fractions pourrait donc être liée à des HAP beaucoup plus bioaccessibles dans l'extrait organique que dans les PM_{2.5-0.3}, facilitant la métabolisation et la rendant plus rapide. Aucune induction significative de l'expression de ces gènes n'a été observée après exposition des cellules au NEM_{2.5-0.3}. Ceci montre que les métaux ne sont pas capables d'induire l'activation des cytochromes, contrairement à des données publiées (Korashy

and El-Kadi, 2004), qui ont suggéré la capacité des métaux lourds à induire l'expression du CYP1A1.

En ce qui concerne les particules quasi-ultrafines, leur extrait organique (EOM_{0.3}) a induit l'expression de tous les gènes testés après 6 et 24 heures d'exposition des BEAS-2B à la plus forte concentration. L'induction de cette voie par les EOM_{0.3} était largement plus importante que celle par les EOM_{2.5-0.3}. Ceci peut être lié au fait que les PM_{0.3} étaient 43 fois plus riches en HAPs que les PM_{2.5-0.3}. L'évaluation des marqueurs de génotoxicité induits suite à l'exposition des Beas-2B aux différents échantillons pendant 48 et 72 heures, aux deux concentrations 3 et 12 µg/cm², a montré que l'extrait organique des particules quasi-ultrafines était capable d'induire davantage de dommages à l'ADN, et un arrêt du cycle cellulaire a été démontré par l'expression protéique des différents marqueurs analysés (ATR, CHK1, CHK2, MDM2, γH2AX, P21 et P53). La **Figure 41** résume les différents résultats de l'étude décrite dans cet article II.

Dans cette étude, des particules atmosphériques fines (PM_{2.5-0.3}) et quasi-ultrafines (PM_{0.3}) ont été échantillonnées dans une zone suburbaine de Beyrouth, capitale du Liban. La caractérisation physico-chimique de ces PM a montré l'influence de la resuspension de particules du sol et des émissions du trafic routier. La fraction organique était plus importante dans les PM_{0.3} que dans les PM_{2.5-0.3}, en raison de la relation entre les processus de combustion, l'émission des composés organiques et les particules ultrafines. L'étude des effets toxiques a suggéré que l'activation métabolique des HAPs adsorbés sur les PM semble être retardée par rapport à celle des HAPs contenus dans l'extrait. De plus, cette étude a montré que toutes les fractions des particules étaient capables d'induire l'expression de protéines impliquées dans les processus génotoxiques. Par contre, cette génotoxicité semble fortement liée à la fraction organique, l'extrait des particules quasi-ultrafines, le plus riche en composés organiques, étant le plus génotoxique.

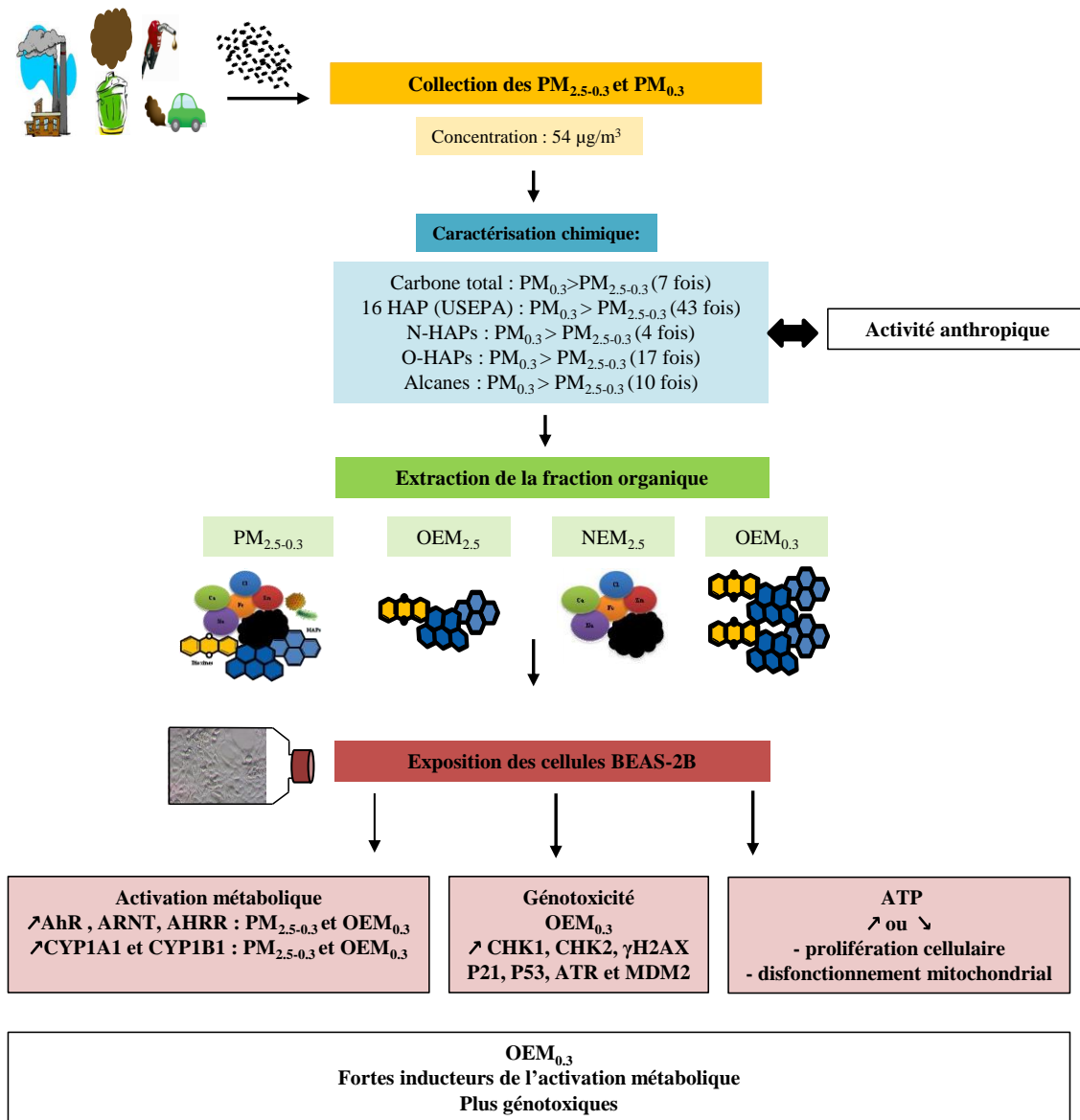


Figure 41: Représentation schématique des différents résultats obtenus dans l'article II.

24 Abstract

25

26 To date no study has been able to clearly attribute the observed toxicological effects of
27 atmospheric particles (PM) to a specific class of components. The toxicity of both the organic
28 extractable matter (OEM_{2.5-0.3}) and non-extractable matter (NEM_{2.5-0.3}) of fine particles
29 (PM_{2.5-0.3}) was compared to that of PM_{2.5-0.3} in its entirety on normal human epithelial
30 bronchial BEAS-2B cells in culture. The specific effect of the quasi-ultrafine fraction (PM_{0.3})
31 was assessed, by comparing the responses of cells exposed to the PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} organic
32 extractable matter, OEM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3} respectively. Chemically, PAH, O-PAH, and
33 N-PAH were respectively 43, 17, and 4 times more concentrated in PM_{0.3} than in PM_{2.5-0.3},
34 suggesting thereby a predominant influence of anthropogenic activities and combustion
35 sources. BEAS-2B cells exposed to PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, EOM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3} lead to
36 different profiles of expression of selected genes and proteins involved in the metabolic
37 activation of PAH, O-PAH, and N-PAH, and in the genotoxicity pathways. Specifically,
38 OEM_{0.3} was the most inducer for phase I and phase II enzymes implicated in the metabolic
39 activation of PAH (*AHR*, *AHRR*, *ARNT*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EPHX-1*, *GSTA-4*) thereby
40 producing the highest DNA damage, felt by ATR and, thereafter, a cascade of protein
41 phosphorylation (CHK1/CHK2/MDM2) closely related to the cell cycle arrest (P21 and P53
42 induction). This study underlined the crucial role played by the organic chemicals present in
43 PM_{0.3}. These results should be considered in any future study looking for the main chemical
44 determinants responsible for the toxicity of ambient fine PM.

45

46 **Keywords:** fine and quasi-ultrafine particles, organic extractable matter, physicochemical
47 characteristics, toxicity, metabolic activation, genotoxicity.

48

49 List of abbreviations:

50 1-NPyr: 1-nitropyrene; 9-FluO: 9-Fluorenone; Ace: Acenaphthalene; Acy: Acenaphthylene;
51 Ant: Anthracene; BaA: Benz[a]anthracene; BaP: Benzo[a]pyrene; BbF:
52 Benzo[b]fluoranthene; BghiP: Benzo[g,h,i]perylene; BkF: Benzo[k]fluoranthene; Chr:
53 Chrysene; DahA: Dibenz[a,h]anthracene; Fla: Fluoranthene; Flu: Fluorene; InPy:
54 Indeno[1,2,3-c,d]pyrene; N-PAH: nitrated-PAH; Nap: Naphthalene; OEM: organic
55 extractable matter; NEM: non-extractable matter; O-PAH: oxygenated-PAH; PAH: polycyclic
56 aromatic hydrocarbons; Phe: Phenanthrene; PM_{2.5-0.3}: particles with an equivalent
57 aerodynamic diameter between 0.3 and 2.5 μm ; PM_{0.3}: particles with an equivalent

58 aerodynamic diameter below 0.3 μm (quasi-ultrafine particles); Pyr: Pyrene; ROS: reactive
59 oxygen species.

60

61 1. Introduction

62 Nowadays, air pollution represents one of the major risk factors for human health:
63 91% of the world's population live in places where air quality exceeds world health
64 organization (WHO) guideline limits and 7 million premature deaths are related to air
65 pollution each year (WHO, 2018). An important part of this threat is due to the specific
66 presence in the atmosphere of particles having an equivalent aerodynamic diameter (EAD)
67 lower than 2.5 μm , also called fine fraction ($\text{PM}_{2.5}$). This latter is classified as carcinogenic
68 group I for humans by the international agency for research on cancer (IARC) (Loomis et al.,
69 2013). $\text{PM}_{2.5}$ includes the ultrafine fraction ($\text{PM}_{0.1}$) which has the ability, in addition to the
70 high deposition potential in the lungs, to translocate to other parts of the body (Stone et al.,
71 2017). Many studies have assessed the toxicity of ambient $\text{PM}_{2.5}$, but much less were
72 interested specifically in ambient $\text{PM}_{0.1}$, mainly due to the technical limitations regarding its
73 sampling and handling. Available studies have generally focused on the toxicity of ultrafine
74 particles related to a well-defined source. Baldauf et al. (2016) have evaluated the toxicity of
75 diesel exhaust particles, which include not only ultrafine particles, but also particles of other
76 diameters, which puts in place an uncertainty to discriminate the respective roles played by
77 the different size fractions. Loxham et al. (2015) were interested in studying the toxicity of
78 size-fractionated underground railway PM. Bendtsen et al. (2018) evaluated the *in-vivo* effects
79 of ultrafine particles related to airport emissions and some other authors such as Farina et al.
80 (2019) reported the effects of biomass burning ultrafine particles. Few studies were dealing
81 with airborne ultrafine PM originated from several source as it is encountered in the ambient
82 air. Between them, we can cite the works done by Carter et al. (2018) considering ambient
83 ultrafine particles retrieved from a filter using water, sonication and lyophilization, as well as
84 the study performed by Gualtieri et al. (2018) who used an air liquid interface exposure
85 system and a cut-off cyclone to expose cells to PM with a diameter estimated in the 8.9 nm to
86 1.5 μm size range.

87 Ambient $\text{PM}_{2.5}$ is a mixture of particles emitted by natural and anthropogenic sources,
88 and in most of the cases during combustion processes related to engine exhausts and biomass
89 burning (Cheng et al., 2015). It forms a heterogeneous complex of inorganic components (*e.g.*
90 metals, salts), organic ones (*e.g.* polycyclic aromatic hydrocarbons: PAH, polychlorinated
91 dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF), polychlorobiphenyls
92 (PCB)), and biological materials (*e.g.* pollen, bacteria, fungi). The assumption that its toxicity
93 depends mainly on its composition is a widely accepted hypothesis (Kelly and Fussell, 2012).
94 However, both the chemical composition and the particle size are widely dependent of the

95 geographic location, meteorological conditions and emission sources, rendering thereby
96 highly complex the identification and the prevision of their toxic effects (Loomis et al.
97 2013). To date, a lot of researches have been devoted to the toxicological responses induced
98 by airborne PM exposure. However, a lack of understanding remains about the specific role of
99 PM chemical components and/or fractions involved in the PM toxicity. As well, there is a
100 growing body of evidence that several parameters should be considered together, such as
101 composition, origin or size of PM, to explain the response a cell models exposed to
102 atmospheric PM (Abbas et al., 2018). It was also intended to gain information on the
103 toxicological effects induced by PM_{2.5} collected under rural, industrial or urban influences, in
104 various seasons and having various physicochemical characteristics (Billet et al., 2018;
105 Dergham et al., 2012, 2015; Melki et al., 2017).

106 Indeed, many studies have confirmed that heavy metals within PM were harmful to
107 human health (de Kok et al., 2006). Among them, transition metals, such as Cr, As, Cd and Ni
108 have been listed as carcinogenic to human (IARC, 2012). They can also induce cells to
109 overproduce reactive oxygen species (ROS), which contribute to the lipid peroxidation of the
110 cell membrane, DNA and protein damage, and even lead the cells to the death (Chen and
111 Lippmann, 2009; Fortoul et al., 2015; Zhang et al., 2018). Among the organic constituents of
112 PM, PAH are of great interest. They are mainly introduced in the atmosphere during
113 combustion process and can be subject to atmospheric physicochemical reactions resulting in
114 the formation of PAH derivatives such as nitrated PAH (N-PAH) and oxygenated PAH (O-
115 PAH) (Abbas et al., 2018). Concentrations of the latter in airborne PM can be very low, but
116 their toxic effects are often considered as higher than those of their parent compounds.
117 Several works have shown that the PM organic extractable matter (OEM) contains toxic and
118 carcinogenic compounds playing a role in the overall PM toxicity without being clearly able
119 to identify the underlying mechanisms (Alessandria et al., 2014; Xiang et al., 2018).
120 Accordingly, PM organic constituents could directly contribute to the induction of an
121 oxidative stress and an inflammatory response in pulmonary cell models as well indirectly
122 after their metabolization (Abbas et al., 2019; Longhin et al., 2013, 2016; Zhou et al., 2014).
123 Even so, complementary works focusing on the critical role of the different PM constituent
124 appears necessary to better understand the PM toxicity. Hence, in the present work, airborne
125 PM with an EAD between 0.3 and 2.5 μm (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM with EAD < 0.3
126 μm , PM_{0.3}) particles were considered. This study aimed at comparing the *in vitro* biological
127 effects and, especially, the relative genotoxic effects of both OEM of PM_{2.5-0.3}, (OEM_{2.5-0.3}),
128 non-extractable matter (NEM) of PM_{2.5-0.3} (NEM_{2.5-0.3}) and PM_{2.5-0.3} considered in its entirety

129 using a relevant normal human epithelial bronchial BEAS-2B cell model. The specific effect
130 of the quasi-ultrafine fraction was also assessed, by exposing cells to the $PM_{2.5-0.3}$ and $PM_{0.3}$
131 organic extractable matter, also called $OEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$, respectively.

132

133

134 2. Materials and Methods

135

136 2.1. PM Sampling

137 The sampling campaign was carried out in the southern suburb of Beirut, Lebanon
138 (Figure S1). This region is characterized by huge road traffic, electricity generation by
139 diesel-powered generators, and suffers from a problem of uncivilized incineration of
140 household waste. The southern suburb of Beirut, belonging to the district of Baabda, has the
141 largest population, reaching one million inhabitants as a result of successive migrations from
142 villages towards the capital. The sampling device was placed on the roof of the Lebanese
143 atomic energy commission (33°50'59" N; 35°29'57"E), at approximately 12 meters from the
144 street level to prevent direct influence of soil particles resuspension. This site, located on the
145 main road between the city center and Beirut airport, is a major axis of travel between Beirut
146 and the southern part of the country. The PM sampling was done continuously from the 1st of
147 January to the 3rd of March 2017 using a high volume five stages plus back-up cascade
148 impactor (model 235, 68 m³/h, Tisch, USA), allowing the separation of collected particles,
149 according to their equivalent aerodynamic diameter. PM with EAD > 2.5 μm was retained on
150 a filter placed on the first stage and was not considered in this study. PM_{2.5-0.3} was impacted
151 on the different impaction plates (stage 2 to 5), while the quasi-ultrafine fraction (PM_{0.3}) was
152 retained on a pure quartz fiber filter (Pallflex® Tissuquartz 2500 QAT-UP, Pall, USA) placed
153 after the impaction system. The system was changed every 5 days. After sampling, impaction
154 plates were dried in a laminar flow hood during 48 h. PM_{2.5-0.3} were recovered from stages 2
155 to 5, weighted, and finally stored at -20 °C until further handling. Back-up filters were placed
156 under laminar flow hood for 48 h as well and frozen at -20°C till further use. At the end of the
157 sampling campaign, individual PM_{2.5-0.3} samples were gathered and carefully homogenized to
158 form an average PM_{2.5-0.3} sample. In a similar manner, average PM_{0.3} samples were
159 constituted by considering a proportional mix of pieces of the individual back-up filters. The
160 methodology for sampling, recovery, and homogenization of PM has been published
161 elsewhere (Borgie et al., 2016). The meteorological conditions encountered during this
162 sampling period were normal for the January and February months. As well, no dust storm
163 was observed during the sampling period as it could suddenly occur in the region.

164

165 2.2. Physicochemical characterization of collected PM

166 Chemical characterization of PM was carried out using several methods. For both
167 PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} samples, total carbon was determined using CHNS/O analyzer (FLASH

168 2000, Fisher Scientific, UK), water-soluble ions were quantified by ion chromatography (IC,
169 model ICS 5000, ThermoElectron, UK) and inorganic composition (major and trace elements)
170 was quantified using inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry (ICP-AES,
171 iCAP 6000 Series, ThermoElectron, UK) as published elsewhere (Borgie et al., 2015; Melki
172 et al., 2017). Quantification of the 16 United-States Environmental Protection Agency
173 (USEPA) priority PAH and n-alkane was carried out by gas chromatography-mass
174 spectrometry (GC-MS, model 1200 TQ, Varian, USA), after ultrasonic extraction with
175 dichloromethane (DCM) for 20 min at 20 °C. The obtained solution was concentrated under
176 nitrogen flux until a volume of 1 mL for analysis. PCDD, PCDF, and PCB concentrations
177 were analyzed by Micropolluants Technology SA (Saint Julien Les Metz, France), using the
178 USEPA methods 1613 and 1668 using high resolution gas chromatography and high-
179 resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS). The concentration of 8 O-PAH and 15 N-PAH
180 was investigated by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical
181 ionization (GC-NCI-MS). This analysis was performed using a 7890B GC system coupled to
182 a 7000D MS detector (Agilent technologies, USA) in Negative Chemical Ionization mode
183 with a DB-5MS-UI capillary column (Agilent technologies). For PM_{2.5-0.3} only, morphology
184 and elemental composition at the particle scale was also studied by Scanning Electron
185 Microscopy (438 VP; LEO Electron Microscopy Ltd, UK) coupled with energy dispersive X-
186 ray analysis (IXRF, Oxford Instruments, UK), SEM-EDX. As well, Identification of PM
187 crystalline phases was done by X-ray diffraction at room temperature (XRD AXS D8
188 Advance, Brüker, Germany) as published elsewhere (Melki et al., 2017).

189

190 **2.3. Sample preparation for toxicological studies**

191 Toxicological approaches were performed on PM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3} and NEM_{2.5-0.3} as
192 well as on the OEM_{0.3}. PM_{0.3} was collected on filters. As PM_{0.3} was trapped within the quartz
193 fibers, it was not possible to retrieve it to test the quasi-ultrafine particles (PM_{0.3}) in its
194 entirety (without filter). Consequently, only an organic extract (OEM_{0.3}) was considered for
195 studying the PM_{0.3} effects. Briefly, to prepare OEM, known masses of PM_{2.5-0.3}, and quasi-
196 ultrafine particles (PM_{0.3}) collected on filters were placed in a glass vial, with 10 mL
197 dichloromethane (DCM), and subjected to a 20 min sonication assisted extraction step at
198 20 °C. After the ultrasonic treatment, the obtained solution was centrifuged (1000 g) for
199 20 min, 20 °C. Then, the supernatant solution containing extracted organics was carefully
200 removed and transferred into a second vial. Remaining PM and filters were then rinsed two
201 times using fresh DCM followed by centrifugation, and supernatant was retrieved again.

202 These extraction and rinse steps were repeated three times on the remaining PM and filters to
203 ensure the recovery of all extractable matter. The remaining PM after the extraction procedure
204 was considered as the non-extractable matter ($NEM_{2.5-0.3}$) and is assumed as the PM skeleton
205 on which the OEM was bound. Finally, the obtained extracts were gathered, and DCM was
206 evaporated and replaced by dimethylsulfoxide (DMSO). Hence, two organic extracts from
207 $PM_{2.5-0.3}$ ($OEM_{2.5-0.3}$) and $PM_{0.3}$ ($OEM_{0.3}$) in DMSO were obtained together with the
208 non-extractable matter of $PM_{2.5-0.3}$ ($NEM_{2.5-0.3}$). Concentrations of final $OEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$
209 solution were respectively 98.1 and 96.4 mg PM-equivalent/mL (PM-eq/mL). The PM-eq/mL
210 unit is in relation with the mass of PM extracted and the final volume of DMSO. Define
211 volumes of these OEM stock solutions were diluted in the LHC-9 culture medium to expose
212 BEAS-2B cells to the desired concentrations of OEM (expressed in $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$).

213

214 **2.4. Evaluation of the toxicity**

215 **2.4.1. Cell culture and exposure**

216 BEAS-2B cells (ATCC® CRL-9609™, ECACC, Wiltshire, UK) were used for the
217 cytotoxicity experiments. BEAS-2B cell line originally derives from normal human bronchial
218 epithelial cells (non-cancerous individuals). BEAS-2B cells used in all the presented tests
219 derived from the same cell culture and were exposed before reaching the confluence (< 80%).
220 Cell culture method has been detailed elsewhere (Leclercq *et al.* 2017a). Briefly, BEAS-2B
221 cells were grown in LHC-9 medium at 37 °C in a humidified air (relative humidity 95%, 5%
222 CO_2) in 75 cm² CellBIND® surface plastic flasks (Corning, USA). Medium was refreshed
223 every 2-3 days. BEAS cells were exposed to control (LHC-9 and DMSO 0.5% in LHC-9) or
224 to one of the different samples ($PM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$ or $OEM_{0.3}$) suspended in
225 LHC-9 at different concentrations ranging from 3 to 96 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$. Non-exposed
226 BEAS-2B cells were used as a negative control for all experiments. In addition,
227 benzo[a]pyrene (BaP) (25 μM), 1-nitropyrene (1-NPyr) (25 μM), 9 fluorenone (9-FluO)
228 (25 μM) were used as positive controls of PAH, N-PAH and O-PAH effects respectively.
229 When exposing to OEM, the DMSO concentration in the culture medium was below 0.5%
230 rendering its toxic effect insignificant (Billet *et al.*, 2018). After 6, 24, 48 and/or 72 h of
231 exposure, aliquots of cell-free culture supernatants media were sampled and quickly frozen (-
232 80 °C) till cytotoxicity assessment. Adherent BEAS-2B cells were washed twice with 1 mL
233 cold sterile PBS, then quickly frozen (-80°C) for further analyses (gene expression and
234 genotoxicity).

235

236 **2.4.2. Evaluation of cytotoxicity**

237 Cytotoxicity of PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3} was evaluated, after
238 exposure of cells to 3, 6, 12, 24, 48 and 96 µg PM-eq/cm² for 6, 24 and 72 h, by the
239 quantification of intracellular ATP using the Cell-Titer-Glo Luminescent cell viability Assay
240 (Promega).

241

242 **2.4.3. Metabolic activation of PAH**

243 Evaluation of gene expression was carried out for several genes implicated in the PAH
244 metabolic pathway: *cytochrome P4501A1: CYP1A1*, *cytochrome P4501B1: CYP1B1*, *Epoxide*
245 *hydrolase 1: EPHX*, and *Glutathione S-Transferase Alpha 4: GSTA4*, in addition to *aryl*
246 *hydrocarbon receptor: AHR*, *Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor: AHRR*, and *aryl*
247 *hydrocarbon receptor nuclear translocator: ARNT*, using quantitative RT-PCR, Taqman™
248 gene expression assays (*ARN18S*: Hs99999901, *AHR*: Hs00169233_m1, *ARNT*:
249 Hs01121918_m1, *AhRR*: Hs01005075_m1, *CYP1A1*: Hs01054797_g1, *CYP1B1*:
250 Hs00164383_m1, *EPHX1*: Hs01116806_m1, *GST-A4*: Hs01119249_m1), as published
251 elsewhere (Abbas et al. 2019). The fold changes (FC) in the mRNA expression levels of the
252 target genes between exposed and control BEAS-2B cells, corrected by the level of RNA18S,
253 were determined using the following equation: FC: 2^{-Δ(ΔCt)}, where ΔCt = Ct(target gene) -
254 Ct(RNA18S gene), and Δ(ΔCt) = ΔCt(exposed group) - ΔCt(control group). Only FC>1.5
255 were considered as biologically significant.

256

257 **2.4.4. Genotoxicity induced by atmospheric PM**

258 The genotoxicity was evaluated using the "Milliplex Map Kit- 7-plex DNA
259 damage/Genotoxicity Magnetic Bead Kit 96-well Plate" based on the Luminex xMAP
260 technology. This Milliplex Kit is used to detect changes in phosphorylated checkpoint kinase
261 1 (CHK-1) (Ser345), phosphorylated checkpoint kinase 2 (CHK-2) (Thr68), phosphorylated
262 H2A histone family member X (H2AX) (Ser139), and phosphorylated protein 53 (pP53)
263 (Ser15) as well as total protein levels of ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR),
264 mouse double minute 2 homolog (MDM2), and protein 21 (P21) in cell lysates, according to
265 the manufacturer's recommendations.

266

267 **2.4.5. Statistical analysis**

268 Results were normalized to control, and presented as mean values and standard
269 deviations. For each incubation time, results from BEAS-2B cells exposed to PM_{2.5-0.3},

270 OEM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3} and OEM_{2.5-0.3} or to positive controls BaP, 1-NPyr, and 9-FluO were
271 compared to those obtained in non-exposed cells using the Mann–Whitney U-test (SPSS
272 software). Significant differences were reported with *p* values <0.05.

273

274

275 3. Results and discussion

276 3.1. PM_{2.5} atmospheric concentrations

277 Concentrations of atmospheric PM_{2.5-0.3}, PM_{0.3} and PM_{2.5} were calculated taking into
278 consideration the mass of collected PM during the two months sampling period, as well as the
279 volume of air that passed through the impactor. In these conditions, the average daily PM_{2.5}
280 atmospheric concentrations, in the southern suburb of Beirut, was 54 µg/m³. This
281 concentration largely exceeds the daily guideline value recommended by the WHO
282 (25 µg/m³) for PM_{2.5}. It was also higher than those reported by Abbas et al. (2019) at the same
283 site in 2016 (48 µg/m³), by Borgie et al. (2015) in the Northern suburb of Beirut in 2011 (41
284 µg/m³), and by Massoud et al. (2011) in three different locations in this city in 2010 (close to
285 20 µg/m³).

286

287 3.2. PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} physico-chemical characteristics

288 3.2.1. Element and water soluble ion content

289 Table 1 represents the average concentration of major and trace elements, water
290 soluble ions and total carbon in fine and quasi-ultrafine particles. Results showed that Ca
291 (13.4% and 10% for PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} respectively), NO₃⁻ (5.6% and 2.9%), Fe (2.6% and
292 1.2%), Al (2.1% and 1.5%), Cl⁻ (1.7% and 2.1%), Mg (1.2% and 1.8%) and Na (1.1% and
293 4.1%), were the major constituents, in addition to SO₄²⁻ (2.7%) in PM_{2.5-0.3} and NH₄⁺ (1.7%)
294 in PM_{0.3}. Then, concentrations of K (0.5% and 0.7%), Cu (0.2% and 0.3%), Ti (0.2% and
295 0.1%) and P (0.1% and 0.1%) were between 0.1% and 1%, in addition to NH₄⁺ (0.1%) and Ba
296 (0.1%) in PM_{2.5-0.3} and SO₄²⁻ (0.7%) and Zn (0.1%) in PM_{0.3}. Finally, the other species, Zn,
297 Mn, Sr, Pb, Cr, V, Sn, Ni, Mo, Co, As, and Cd showed concentrations below 0.1% for both
298 PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3}, in addition to Ba in PM_{0.3}. The presence of elements such as Al, Ca, Fe,
299 Mg, Ca, and Ti within the atmospheric particles can be related to the resuspension of soil dust
300 (Wedepohl, 1995). Particularly, the predominance of Ca element could be related to the soil
301 type in Lebanon, which is typically calcareous (Verheye, 1973). It was also confirmed by
302 XRD analysis that evidenced the presence of calcite (Figure S2). Calcium was also found in
303 the form of gypsum, as confirmed by individual particle analysis done by SEM-EDX analysis,
304 evidencing Ca and S containing particles (Figure S3). Using XRD, Al was also detected in the
305 kaolinite form, which is one of the minerals commonly identified in Lebanese soils (Al-
306 Zubaidi et al., 2011).

307 Minerals and metals are generally considered as the main components of PM collected
308 from roadsides as a result of the re-suspension by traffic of road dust and particles generated

309 by the wear of mobile parts of vehicles, such as tires, brake or clutch disk (Putaud et al.,
310 2004). Indeed, trace elements showing the influence of vehicular emissions were also detected
311 (Ba, Ni, and Zn) (Gietl et al., 2010).

312 NO_3^- and SO_4^{2-} , the major ions detected in PM, can be originated from gas to particle
313 conversion of NO_x and SO_2 precursor gases as well as from long range transport (Borgie et
314 al., 2016; Luria et al., 1989). Indeed, in Lebanon, it was estimated that road transport
315 contributes to 52% of the NO_x emissions. In addition, SO_2 emissions are mainly related to
316 industrial activities and electricity production from the combustion of heavy fuel oil, with
317 sulfur content between 25,000 and 30,000 ppm. The latter are also used in domestic generator
318 sets and diesel heavy vehicles (buses and trucks) (Waked et al., 2012).

319 The concentration of total carbon was about 7-fold higher in $\text{PM}_{0.3}$ compared to
320 $\text{PM}_{2.5-0.3}$ (126 vs 17.5 mg/g). This highest concentration in the quasi-ultrafine particles may be
321 linked to the contribution of soot known to belong to this size fraction in relation with the
322 combustion process largely influenced by the huge road traffic close to the sampling site.

323

324 **3.2.2. Organic composition**

325 The determination of the 16 USEPA priority PAH showed that $\text{PM}_{2.5-0.3}$ and $\text{PM}_{0.3}$ had
326 substantially similar profiles with an important representation of the higher molecular weight
327 PAH (i.e., 4 aromatic rings or more) (Table 2). The concentration of PAH found in $\text{PM}_{0.3}$ was
328 about 43 times higher than in $\text{PM}_{2.5-0.3}$, proving thereby a major influence of anthropogenic
329 activities and combustion sources (industries, road traffic and electric generators) on the
330 emission of quasi-ultrafine particles. Among them, dibenz[a,h]anthracene,
331 benzo[b]fluoranthene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, benzo[a]pyrene, and chrysene were
332 predominant. They are usually emitted by combustion sources including gasoline motor
333 vehicles, biomass burning, and industrial process (INERIS, 2005). To investigate the PAH
334 emission sources, PAH diagnostic ratios were calculated and compared with those available in
335 the current literature (Table 3). The Fla/(Fla+Pyr) ratio value was ranging from 0.4 to 0.5
336 indicating fossil fuel combustion as a source of PAH. The (Fla/Pyr) ratio higher than 0.6 (0.92
337 and 0.79 respectively for $\text{PM}_{2.5-0.3}$ and $\text{PM}_{0.3}$ as well as the BaP/(BaP+Chry) higher than 0.35
338 (0.43 and 0.59) suggested the influence of traffic emissions. Finally, the Flu/(Flu+Pyr) ratio
339 values, 0.44 and 0.48 respectively, were slightly lower than 0.5 indicating a major influence
340 of gasoline emissions versus diesel ones. The use of BaP-toxic equivalent factor (BaP-TEQ)
341 to PAH concentrations can provide an indicator of the carcinogenic risk related to PAH
342 environmental exposure. PAH concentrations were converted in BaP-TEQ concentration

343 using the factors published by (Kumar et al., 2018) and (Nisbet and LaGoy, 1992). This
344 calculation showed that the considered $PM_{2.5}$ ($PM_{2.5-0.3} + PM_{0.3}$) had a huge carcinogenic
345 potential with 8.2 ng/m^3 BaP-TEQ. This value is clearly higher than the BaP WHO guideline
346 (0.12 ng/m^3 ; cancer risk 1/100 000). The highest BaP-TEQ values were for
347 dibenz[a]anthracene (3.9 ng/m^3 BaP-TEQ) followed by BaP (2.5 ng/m^3 BaP-TEQ) and
348 indeno[1,2,3-cd]pyrene (0.7 ng/m^3 BaP-TEQ).

349 Moreover, six O-PAH and nine N-PAH were detected in PM (Table 2). Total
350 concentration of O-PAH was higher than those of N-PAH as already reported in other studies
351 (Abbas et al., 2018; Albinet et al., 2007). In addition, concentrations of O-PAH and N-PAH
352 were respectively 17 and 4-fold higher in $PM_{0.3}$ compared to $PM_{2.5-0.3}$. Among O-PAH
353 congeners, 1,8-naphthamic anhydride, 7H-benzo(de)anthracen-7-one, and 9,10-anthraquinone
354 were the most abundant in $PM_{2.5}$ (45 , 28 and $21 \text{ } \mu\text{g/g}$, respectively). The 2-nitroanthracene
355 and 7-nitrobenz(a)anthracene were the most abundant nitro-PAH ($4.9 \text{ } \mu\text{g/g}$ and $3.7 \text{ } \mu\text{g/g}$
356 respectively). The emission sources of these compounds are still not well explored in the
357 literature; O-PAH and N-PAH also originate as direct or indirect products of incomplete
358 combustion (Abbas et al., 2018). Indeed, 1 nitropyrene is the most abundant pyrene in diesel
359 exhaust emissions (Bamford et al., 2003). Some N-PAH were used in industries such as the
360 5-nitroacenaphthene, which is an intermediate in the synthesis of naphthalimide dyes that
361 are used in biomedical applications or as fluorescent whitening agents and photochemical
362 agents (WHO, 2003; Zhang et al., 2016). Concentrations and profiles of n-alkanes are
363 presented in Figure S4. As observed for PAH and PAH derivatives, quasi-ultrafine particles
364 were as well more concentrated in n-alkanes (10-fold higher) than fine ones. Two different
365 distribution profiles were evidenced with a main difference for C29 and C31. Odd n-alkanes
366 are known to mainly derive from natural origins whereas even ones can be related to
367 anthropogenic origins (Waples, 1985). The carbon maximum number (C_{max}) has been used to
368 evaluate the sources of n-alkanes (Chen et al., 2014). Higher value of C_{max} indicated that n-
369 alkanes primary originated from terrestrial plants, while lower C_{max} was associated with
370 anthropogenic sources. For fine particles, C_{max} was 31, while for quasi-ultrafine particles, it
371 was 24, showing the influence of anthropogenic emissions in the latter's composition. The
372 carbon preference index (CPI), can be used to determine the sources of n-alkanes and was
373 calculated as published in Melki et al. (2017). Values of overall CPI_{21-31} and high CPI were
374 respectively 1.35 and 1.65 for the fine particles and 1.06 and 1.41 for the quasi-ultrafine
375 particles. These ratio value suggested that alkanes were originated from both natural and
376 anthropogenic sources ($1.5 < \text{high CPI} < 3$ and overall $CPI > 1$) in fine particles, while they

377 mainly derived from anthropogenic sources (high CPI < 1.5 and overall CPI close to 1) in
378 quasi-ultrafine ones (Figure S4).

379 The total concentrations of PCDD, PCDF and PCB were respectively 30.7 ng/g (1100
380 fg/m³), 40.4 ng/g (1170 fg/m³), and 27.9 ng/g (770 fg/m³) in fine particles. It should be
381 noticed that concentrations of these compounds were higher in the quasi-ultrafine fraction
382 than in the fine one (PCB: 15.7 vs 12.2 ng/g, PCDD: 25.2 vs 5.5 ng/g, and PCDF: 26.4 vs
383 14 ng/g respectively) (Table 2). By comparing the values found in this study with previous
384 published ones, the concentrations of PCDD and PCDF were almost twice higher than those
385 determined at the same site in 2015 by Abbas et al (2019): 1100 vs 449 fg/m³ and 1170 vs 560
386 fg/m³ respectively. Furthermore, the concentration of dioxins and furans were respectively
387 about 4.4 (770 vs 214 fg/m³) and 13-fold (1170 vs 87 fg/m³) higher than that found in 2015 in
388 the northern suburb of Beirut by Borgie et al. (2015). These higher concentrations could be
389 related to the worst solid waste management crisis in Lebanon, since 2015, when open air
390 waste burning has become a common practice in Beirut (Baalbaki et al., 2018).

391

392 **3.3. Evaluation of PM toxicity**

393 The comparison of the effects of OEM_{2.5-0.3} and NEM_{2.5-0.3} vs PM_{2.5-0.3} on the one hand,
394 and OEM_{0.3} vs OEM_{2.5-0.3} on the other hand, were thereafter carried out to better investigate
395 the critical role of chemicals related to a specific size fractions and/or to the extractable/non-
396 extractable fractions involved in the cellular and molecular damages induced by PM.
397 Cytotoxicity, pathways of metabolic activation of the PAH and other related compounds, as
398 well as pathways of genotoxicity-DNA damage were also the critical toxicological endpoints
399 under study.

400

401 **3.3.1. Cytotoxicity**

402 Evaluation of cytotoxicity was carried out using the quantification of intracellular ATP
403 (Figure S5). The exposure of BEAS-2B cells to PM_{2.5-0.3} and NEM_{2.5-0.3} showed a significant
404 decrease in ATP after 6 and 24 h of exposure to 6, 12, 24, 48 and 96 µg/cm² (dose-
405 dependent). For the time corresponding to 72 hours of exposure, ATP concentrations slightly
406 increased when BEAS-2B cells were exposed to low and moderate concentrations (3, 6, 12,
407 24 and 48 µg PM-eq/cm²) and decreased significantly when exposed to the highest
408 concentration of PM_{2.5-0.3} (96 µg/cm²) and NEM_{2.5-0.3} (48 and 96 µg/cm²). The increase of
409 ATP concentrations in exposed cells for longest time (> 24 hours which is the minimum time
410 required for cell division) is related to the proliferation of cells which is naturally

411 accompanied by an increase of ATP concentration. Decrease of ATP concentration indicated
412 a mitochondrial dysfunction and proved the ability of $PM_{2.5-0.3}$ to induce toxicity, even at the
413 lowest doses and the shortest times. A more pronounced effect was observed for the highest
414 doses. The toxicity of the $OEM_{0.3}$, after 72 h of exposure to the two highest concentrations (48
415 and 96 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$) was the most remarkable. The ATP concentration decrease was
416 significantly higher for cells exposed to $OEM_{0.3}$ in comparison with cells exposed to
417 $OEM_{2.5-0.3}$ ($p < 0.020$ and $p < 0.034$ for the two doses respectively). This could be explained by
418 the highest concentration of PAH and organic compounds in $PM_{0.3}$ compared to $PM_{2.5-0.3}$.

419 Based on the above-detailed results, two concentrations of exposure ensuring
420 sufficient doses to observe some harmful effects without a massive cell death were selected
421 for the study of the other toxicological endpoints. Indeed, the two considered doses, 3 and
422 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$ were also among the lowest reported in the literature to give harmful effects
423 whilst limiting a massive cell death (Boublil et al. 2013, Leclercq et al. 2016, 2017b, Gualtieri
424 et al., 2010, Longhin et al. 2013).

425

426 3.3.2. *Metabolic activation*

427 PAH are known to enter into the cell through cytoplasmic membrane before binding to
428 the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Following ligand binding, the PAH-AHR complex
429 translocates to the nucleus and forms a heterodimer with its nuclear translocator (aryl receptor
430 nuclear translocator, ARNT). This latter then binds to a specific region of the DNA called
431 xenobiotic response element (XRE), recruits the RNA polymerase II and induces the
432 transcription of several genes, included in the AhR gene battery. It is also implicated in the
433 metabolic activation of PAH into more easily eliminable metabolites (Puga et al., 2009).
434 Among them, phase I enzymes (CYP1A1 and CYP1B1) and phase II enzymes (EPHX-1 and
435 GSTA-4) are closely involved (Dietrich, 2016; Rogers et al., 2017). The main function of the
436 AHR signaling pathway is to activate parent PAH and thereafter to conjugate their highly
437 electrophilic intermediate metabolites with highly hydrophilic groups in order to easily
438 eliminate them from cells and organism thereby avoiding severe toxic effects.

439 In this study, the expression of some selected genes involved in the AhR signaling
440 pathway was evaluated after exposure of BEAS-2B cells to PM, NEM and OEM at 3 and 12
441 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$ for 6 and 24 h.

442 Exposure of BEAS-2B cells to $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$ and $EOM_{0.3}$ revealed
443 different gene expression profiles of some key proteins involved in the metabolic activation of
444 PAH (Table 4). $PM_{2.5-0.3}$ in its entirety was able to induce significant gene expressions of

445 *AHR, AHRR, ARNT, CYP1A1, CYP1B1* and *GSTA-4*, 6 and 24 h after cell exposure to the two
446 doses. Results obtained for positive controls (BaP, 1-Npyr and 9-FluO) confirmed the
447 activation of the AHR signaling pathway by exogenous chemicals in BEAS-2B cells. In
448 general, metabolic activation helps to decrease the toxicity of pollutants. However, this
449 metabolization can form metabolites with higher toxicity than initial molecules (Saint-
450 Georges et al., 2008, 2009). Gualtieri et al. (2011) also reported that the AHR signaling
451 pathway was activated in BEAS-2B cells exposed to PM_{2.5} and PM₁₀ collected in urban
452 background area in relation with their high PAH contents. In contrast, no significant induction
453 of these genes was observed in BEAS-2B cells exposed to NEM_{2.5}, whatever the tested dose
454 and time. In comparison, Billet et al. (2006, 2008) have used PM having undergone a thermal
455 desorption under vacuum (dPM) before studying the metabolic activation. The technique used
456 preserve the PM inorganic structure while organic chemicals were desorbed. Somewhat
457 surprising result was the effective transcription of *CYP1A1* gene cells derived from a
458 type II-like human alveolar epithelial carcinoma (A549 cell line) exposed to dPM, thereby
459 supporting that the 400°C thermal desorption under vacuum was not enough sufficient for
460 removing totally the organic fraction. In contrast, as NEM_{2.5-0.3} did not significantly induce
461 metabolic activation, the method used here seemed to be more efficient to recover both OEM
462 and organics almost free NEM.

463 For OEM_{2.5-0.3}, a significant increase of the gene expression of *CYP1A1* and *CYP1B1*
464 was observed only 6 h after the exposure and only for the highest dose. Accordingly, Oh *et al.*
465 (2011) indicated that OEM which contain aliphatic chlorinated hydrocarbons, PAH/their alkyl
466 derivatives and nitro-AH/ketones/quinones, induced CYP1A1-dependent EROD activity,
467 through AHR signaling pathway activation. After 24 h of exposure to OEM_{2.5-0.3}, no
468 significant gene expression was observed. In comparison, PM_{2.5-0.3} was able to induce
469 *CYP1A1* and *CYP1B1* gene expression after 6 h of exposure at the lowest dose and after 24h
470 of exposure as well. One explanation could be related to both the kinetics of metabolic
471 activation, the difference regarding the bio-accessibility of PAHs in PM_{2.5-0.3} and OEM_{2.5-0.3}
472 (these points will be further discussed below) and the contribution of some metallic species
473 only present in PM_{2.5-0.3}. For this latter, Garçon et al. (2004a, 2004b) reported that the
474 concurrent exposure to Fe₂O₃ particles and BaP favors dramatically the metabolic activation
475 of PAH by phase I enzymes (i.e., CYP1A1) to the detriment of the inactivation of PAH
476 metabolites by phase II enzymes (i.e., GST-YA). They finally concluded that the kinetics of
477 the adverse effects might be different depending on the presence or absence of BaP on Fe₂O₃
478 particles. Korashy et al. (2005) also reported that *CYP1A1* gene expression could be induced

479 by heavy metals (Korashy and El-Kadi, 2004). Nevertheless, the NEM_{2.5-0.3} fraction was not
480 able to induce metabolic activation allowing to reject this hypothesis.

481 Regarding the quasi-ultrafine fraction, OEM_{0.3} was able to induce a significant
482 expression of all tested genes involved in the AHR signaling pathway 6 and 24 h after
483 exposure, mainly to the highest tested dose (Table 4). Compared with OEM_{2.5-0.3}, OEM_{0.3} led
484 to a higher expression of the proteins involved in the AHR signaling pathway. This could be
485 closely related to the much higher contents of PAH and other related compounds in OEM_{0.3}
486 compared with OEM_{2.5-0.3} (till 43 times higher for PAH). This result is in agreement with a
487 recent study showing the significant induction of the two AHR-related CYP, *CYP1A1* and
488 *CYP1B1*, in BEAS-2B cells 6 and 24h after their exposure to increasing concentrations of
489 PM_{2.5} OEM, ranging from 3 to 30 µg PM-eq/cm² (Abbas et al., 2019). Using the same
490 concentrations as those used in this study, Borgie et al. (2015) reported also the effective up-
491 regulation of the gene transcription of *CYP1A1* and *CYP1B1*, 24, 48, and 72 h after the
492 exposure of BEAS-2B cells to OEM_{0.3}.

493 Taken together, these results supported not only the significant activation of the AHR
494 signaling pathway by the PAH but also put into question both the bioavailability of PM-
495 linked-PAH vs PAH in an organic extract, the kinetics of the metabolic activation and the
496 dose parameter. PM_{2.5-0.3} and OEM_{2.5-0.3} have the same PAH composition. Nevertheless,
497 *CYP1A1* and *CYP1B1* expression were not the same for both samples. Especially, no
498 expression was observed for 6 h of exposure at the lowest dose for OEM_{2.5-0.3}, as well at 24 h,
499 for all the doses. In OEM_{2.5-0.3}, PAH are highly bio-accessible compared to PAH linked to
500 PM_{2.5-0.3}. This higher bio-accessibility could be responsible for a quicker metabolic activation
501 of PAH. It can be suggested that this one took less than 6 hours to be completed especially
502 when doses (and PAH concentrations) are low. This hypothesis is reinforced by the fact that
503 no metabolic activation was observed at 24 hours as well. The early metabolic activation of
504 PAH was also observed by Totlandsdal et al. (2010) who have studied the *CYP1A1* expression
505 of BEAS-2B cells exposed to Diesel Exhaust Particles (DEP) for 2, 4 and 8 h. They found that
506 the *CYP1A1* gene expression occurred at early time with a pronounced increase after 2 hours
507 of exposure and a levelling off at 4 and 8 h. Then, after 24 h, the level of this gene was lower
508 than the one observed at 8 h. Also testing DEP but considering HBEC3 cells, Rynning et al.
509 (2018) measured a *CYP1A1* gene expression after 24 hours. It was the shortest time
510 considered in their study. However, Brinchmann et al. (2018) have considered DEP exposure
511 using a 3D tri-culture (A549/THP-1/EA.hy926) model for 2 h and 20 h. They have also
512 studied the DEP-OEM exposure using HMEC-1 cells for 2 and 24 h. They observed a

513 *CYP1B1* significant expression in the epithelial side of the 3D model after only 2 h of
514 exposure at DEP. This gene expression was also much higher after 20 h of exposure
515 compared to 2 h. DEP-OEM exposed HMEC-1 cells also show a significant *CYP1A1* and
516 *CYP1B1* gene expression after 2 h, staying quite constant after 24 h of exposure. Taken
517 together these results are in agreement with an early metabolic activation of PAH that can be
518 spread out over time especially when PAH are linked to PM (reduced accessibility and slow
519 release). The fact that the metabolization of PAH in $PM_{2.5-0.3}$ appears to be time-shifted and
520 spread-out compared to PAH in $OEM_{2.5-0.3}$ is also consistent with this statement. For higher
521 PAH content such as that in $OEM_{0.3}$, the metabolization of PAH seems to be extended
522 compared to $OEM_{2.5-0.3}$.

523 Finally and in agreement with previous works done by Garçon et al. (2004a, 2004b),
524 these results involve also two hypotheses based on the bioavailability and bioaccessibility of
525 organic compounds, whether those linked to PM, or found in the organic extract. The first one
526 support the idea that particles represent a vector which facilitates penetration of organic
527 compounds into the cell by endocytosis (Chen et al., 2016). The second hypothesis is based
528 on the lipophilic properties of organic compounds. They can easily and even quickly penetrate
529 the cell through the cytoplasmic membrane to be freely metabolized within the cell.
530 Accordingly, Brinchmann et al (2018) reported that the fast induction of AhR-regulated genes
531 in the basolateral endothelial cells of their alveolar 3D tri-culture model exposed to relevant
532 concentrations of DEP ($0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) seemed mainly to be due to the soluble lipophilic
533 constituents rather than particle translocation. Indeed, DEP-EOM, next fractionated with
534 increasing polarity, chemically characterized, and examined for direct effects on
535 AhR-regulated genes in human microvascular endothelial cells and primary human
536 endothelial cells, supported that the most lipophilic EOM, that contained the majority of AhR
537 agonists such as PAH, had the clearest low-concentration effects. The different kinetics
538 observed for PM and OEM could also be related to the fact that PAH linked to PM could be
539 only progressively released in cell cytoplasm after particle internalization, and subsequently
540 metabolized, while free PAH in the organic extract can be metabolized directly once in the
541 cell.

542

543 **3.3.3. Evaluation of genotoxicity biomarkers**

544 Given the complexity of atmospheric particles, the identification of the chemical
545 compounds responsible for the genotoxic effect is still not clear. Several studies suggested the
546 role of PAH, and therefore of the organic fraction, while other studies suggested the role of

547 water soluble (Pralhad et al., 2001) and non-water soluble metals (Ghio, 1999; Knaapen et
548 al., 2002) in the initiation of oxidative stress and DNA damage. The different DNA lesions
549 can be caused by a wide variety of agents. If they are still present during replication, tolerance
550 mechanisms can be put in place. For each type of lesion, specific repair mechanisms exist.
551 Thus, to maintain the integrity of the genome, eukaryotic cells have established signaling
552 pathways that are activated in response to DNA damage. In case of DNA damage, the ATR
553 and ATM sensors phosphorylate a number of downstream proteins, such as CHK1, CHK2 and
554 P53, in addition to the activation of MDM2 and P21, allowing the cell cycle to be stopped, in
555 order to provide the cell to repair its DNA with time, but also to induce apoptosis in the case
556 of cells with serious lesions (Asimuddin and Jamil, 2012).

557 Proteins involved in the genotoxicity pathway including phosphorylated ones,
558 p-CHK1, p-CHK2, p-H2AX, p-P53, and total proteins, ATR, MDM2, and P21, have been
559 tested after exposure of BEAS-2B cells to the different fraction of PM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3} for 24
560 and 72 h. A very weak induction of the proteins involved in this pathway following the
561 exposure of BEAS-2B cells to the different fractions of PM_{2.5-0.3}, including NEM_{2.5-0.3} (Table
562 5) was observed. This indicates that most of the biologically active metabolites resulting from
563 the metabolic activation of PM, their organic extract and the non-extractable fraction, are all
564 conjugated during the phase II of this process and removed from the cell. However, different
565 results were reported with OEM_{0.3}. The highest dose of OEM_{0.3} was able to induce a
566 significant increase of ATR, p-CHK1 and p-CHK2, MDM2, P21, and p-P53, almost only
567 after 72 h (Table 5). EOM_{0.3} contains relatively high proportion of organic compounds
568 compared to OEM_{2.5-0.3}. It is clearly observed that EOM_{0.3} induced DNA damage felt by ATR
569 and followed by a cascade of protein phosphorylation, thereby contributing to the cell cycle
570 arrest (i.e., P21 and P53 induction). Accordingly, higher levels of phosphorylated P53, CHK1
571 and CHK2 were generally related to the cell cycle arrest (Fragkos et al., 2009).

572 In addition, this study showed a significant decrease in phosphorylated H2AX in
573 BEAS-2B exposed for 72 h to the two doses of OEM_{2.5-0.3}. In addition, the same decrease was
574 observed after 72 hours of exposure to NEM_{2.5-0.3} at 3 and 12 µg PM-eq/cm², and to
575 3 µg PM-eq/cm² of OEM_{0.3}. These results are in agreement with those published by Abbas et
576 al. (2019) and Bouquet et al. (2006) showing that, at low doses of exposure, the DNA repair
577 mechanism was highly active leading to the degradation of phosphorylated H2AX. They also
578 observed that, at high doses of exposure, the DNA repair mechanism seemed to be less active
579 leading to phosphorylated H2AX accumulation, which is also the case in this study as shown
580 for OEM_{0.3}, 72 h and 12 µg PM-eq/cm².

581 With regards to the different chemical compounds tested as positive controls, BaP was
582 able to activate the DNA damage pathway by inducing the expression of several studied
583 proteins including p-CHK2, p-H2AX, and p-P53, after 24 h, and p-CHK1 and p-CHK2 after
584 72 h. Moreover, 1-NPyr significantly induced expression of p-CHK2 and p-P53, after 24 h,
585 and of p-P53 after 72 h. In contrast, cells exposed to the 9-FluO didn't show any significant
586 expression of the studied proteins.

587 Taken together, these results showed that the exposure to OEM_{0,3} was able to induce
588 the expression of most of the studied proteins related to cell cycle arrest and DNA damages.
589 In addition, these results showed that BaP and 1-NPyr were able to induce DNA damages,
590 while 9-FluO, the positive control used for O-PAH toxicity evaluation was not.

591

592 4. Conclusion

593 In the present work, PM was collected at the southern suburbs of Beirut. Chemical
594 analysis clearly showed the influence of soil resuspension and also traffic emissions. Organic
595 fraction analysis showed that the contents of PAH and n-alkanes were far higher in PM_{0.3} than
596 PM_{2.5-0.3}, which supports a strongly relation between the combustion process emission and the
597 ultrafine particle composition. Toxicological studies suggested that the metabolic activation of
598 PAH contained in PM_{2.5-0.3} in its entirety was delayed in comparison with PAH in OEM. The
599 NEM was not able to significantly express genes involved in the metabolic activation pathway
600 of organic compounds. All the tested PM fractions, including the NEM were able to increase
601 the expression of the studied proteins involved in the genotoxicity pathway. In addition, the
602 PM-induced genotoxicity appeared to be strongly related to the organic chemical contents.
603 The quasi-ultrafine particles were the most genotoxic due the predominance of organic
604 compounds such as PAH in this size fraction. The obtained results confirmed that considering
605 only OEM or NEM might lead to results regarding mechanisms and kinetics of toxicity that
606 would be different of those obtained from cells exposed to PM considered in its entirety. This
607 work evidenced that the co-presence of organic compounds and other inorganic elements
608 (such as metals and trace elements) may determine the biological effects of fine PM as a
609 whole. It also shows that organic compounds associated to the quasi-ultrafine fraction are the
610 main drivers of the fine PM genotoxicity and phase I and phase II enzymes implicated in the
611 metabolic activation of PAH. Finally, this study underlined the importance of evaluating the
612 biological impact of ultrafine and quasi-ultrafine particles for a better understanding of the
613 health effects related to exposure to the fine PM.

614

615 Acknowledgments:

616 The research described in this article was financially supported by the Lebanese
617 Atomic Energy Commission of the National Council for Scientific Research of Lebanon, the
618 Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant” (UCEIV-EA4492) and
619 “IMPacts de l’Environnement Chimique sur la Santé” (IMPECS- EA4483). UCEIV and
620 IMPECS participate in the CLIMIBIO project, which is financially supported by the Hauts-
621 de-France Region Council, the French Ministry of Higher Education and Research, and the
622 European Regional Development Funds.” The authors would like to thank Dr A. HACHIMI
623 from Micropollutants technologie (Saint-Julien les Metz, France), for the determination of
624 Dioxins, Furans and PCBs within air pollution PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3}

625

626 References:

- 627 Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., Garçon, G., 2018.
628 Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources,
629 analysis and toxicity. *Environ. Chem. Lett.* 16, 439–475.
630 <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0>
- 631 Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D.,
632 Garçon, G., 2019. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5}
633 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-
634 inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environ. Res.* 171,
635 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- 636 Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E., 2007. Polycyclic aromatic
637 hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the
638 Marseilles area (South of France): Concentrations and sources. *Sci. Total Environ.*
639 384, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.028>
- 640 Alessandria, L., Schilirò, T., Degan, R., Traversi, D., Gilli, G., 2014. Cytotoxic response in
641 human lung epithelial cells and ion characteristics of urban-air particles from Torino, a
642 northern Italian city. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 5554–5564.
643 <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2468-1>
- 644 Al-Zubaidi, A., Bashour, I., Darwish, T., Safieddine, M., 2011. Content of Different Forms of
645 Potassium in Lebanese Soils. Presented at the IPI-EGE University International
646 Symposium on “Soil Management and Potash Fertilizer Use in the West Asia and
647 North Africa Region”, 22-25 November 2010, Antalya, Turkey. E-Ifc 28.
- 648 Asimuddin, M., Jamil, K., 2012. Insight into the DNA repair mechanism operating during cell
649 cycle checkpoints in eukaryotic cells. *Biol. Med.* 21.
- 650 Baalbaki, R., Nassar, J., Salloum, S., Shihadeh, A.L., Lakkis, I., Saliba, N.A., 2018.
651 Comparison of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three urban
652 areas in Lebanon. *Atmos. Environ.* 179, 260–267.
653 <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.02.028>
- 654 Baldauf, R.W., Devlin, R.B., Gehr, P., Giannelli, R., Hassett-Sipple, B., Jung, H., Martini, G.,
655 McDonald, J., Sacks, J.D., Walker, K., 2016. Ultrafine Particle Metrics and Research
656 Considerations: Review of the 2015 UFP Workshop. *Int. J. Environ. Res. Public*
657 *Health* 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111054>
- 658 Bamford, H.A., Bezabeh, D.Z., Schantz, M.M., Wise, S.A., Baker, J.E., 2003. Determination
659 and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and
660 diesel particulate reference materials. *Chemosphere* 50, 575–587.
661 [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00667-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00667-7)
- 662 Bendtsen, K.M., Brostrøm, A., Koivisto, A.J., Koponen, I., Berthing, T., Bertram, N., Kling,
663 K.I., Dal Maso, M., Kangasniemi, O., Poikkimäki, M., Loeschner, K., Clausen, P.A.,
664 Wolff, H., Jensen, K.A., Saber, A.T., Vogel, U., 2019. Airport emission particles:
665 exposure characterization and toxicity following intratracheal instillation in mice.
666 *Particle and Fibre Toxicology* 16:23. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0305-5>
- 667 Billet, S., Ledoux, F., Dagher, Z., Courcot, D., Garçon, G., Cazier, F., Shirali, P., Aboukaïs,
668 A., 2006. Stability of organic compounds in atmospheric particulate matter and its
669 relation with textural properties. *Chemical Engineering Transactions* 10, 101-107.
- 670 Billet, S., Abbas, I., Goff, J.L., Verdin, A., André, V., Lafargue, P.-E., Hachimi, A., Cazier,
671 F., Sichel, F., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of Polycyclic
672 Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human

673 lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* 270, 144–155.
674 <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.044>

675 Billet, S., Landkocz, Y., Martin, P.J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier,
676 F., Sichel, F., Shirali, P., Gosset, P., Courcot, D., 2018. Chemical characterization of
677 fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts
678 on pulmonary cells. *J. Environ. Sci.* 71, 168–178.
679 <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.022>

680 Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Martin, P., Hachimi, A., Shirali,
681 P., Greige-Gerges, H., Courcot, D., 2015. Comparison between ultrafine and fine
682 particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, *in vitro* cytotoxic
683 effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells.
684 *Environ. Pollut.* 205, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.027>

685 Borgie, M., Ledoux, F., Dagher, Z., Verdin, A., Cazier, F., Courcot, L., Shirali, P., Greige-
686 Gerges, H., Courcot, D., 2016. Chemical characteristics of PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} and
687 consequence of a dust storm episode at an urban site in Lebanon. *Atmospheric Res.*
688 180, 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.06.001>

689 Boubilil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban,
690 A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium
691 *in vitro* to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicology in Vitro* 27,
692 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>

693 Bouquet, F., Muller, C., Salles, B., 2006. The loss of gamma H2AX signal is a marker of
694 DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5,
695 1116–1122. <https://doi.org/10.4161/cc.5.10.2799>

696 Brinchmann, B.C., Skuland, T., Rambøl, M.H., Szoke, K., Brinchmann, J.E., Gutleb, A.C.,
697 Moschini, E., Kubátová, A., Kukowski, K., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossman, D.,
698 Schwarze, P.E., Låg, M., Refsnes, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., 2018. Lipophilic
699 components of diesel exhaust particles induce pro-inflammatory responses in human
700 endothelial cells through AhR dependent pathway(s). *Part. Fibre Toxicol.* 15:21.
701 <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0257-1>

702 Carter, J.D., Madamanchi, N.R., Stouffer, G.A., Runge, M.S., Cascio, W.E., Tong, H., 2018.
703 Ultrafine particulate matter exposure impairs vasorelaxant response in superoxide
704 dismutase 2-deficient murine aortic rings. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81, 106–115.
705 <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1420504>

706 Chen, L.C., Lippmann, M., 2009. Effects of Metals within Ambient Air Particulate Matter
707 (PM) on Human Health. *Inhal. Toxicol.* 21, 1–31.
708 <https://doi.org/10.1080/08958370802105405>

709 Chen, Y., Cao, J., Zhao, J., Xu, H., Arimoto, R., Wang, G., Han, Y., Shen, Z., Li, G., 2014. n-
710 Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulates from the
711 southeastern Tibetan Plateau: Concentrations, seasonal variations, and sources. *Sci.*
712 *Total Environ.* 470–471, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.033>

713 Cheng, Y., Lee, S., Gu, Z., Ho, K., Zhang, Y., Huang, Y., Chow, J.C., Watson, J.G., Cao, J.,
714 Zhang, R., 2015. PM_{2.5} and PM_{10-2.5} chemical composition and source apportionment
715 near a Hong Kong roadway. *Particuology* 18, 96–104.
716 <https://doi.org/10.1016/j.partic.2013.10.003>

717 Chen, Z.-H., Wu, Y.-F., Wang, P.-L., Wu, Y.-P., Li, Z.-Y., Zhao, Y., Zhou, J.-S., Zhu, C.,
718 Cao, C., Mao, Y.-Y., Xu, F., Wang, B.-B., Cormier, S.A., Ying, S.-M., Li, W., Shen,
719 H.-H., 2016. Autophagy is essential for ultrafine particle-induced inflammation and
720 mucus hyperproduction in airway epithelium. *Autophagy* 12, 297–311.
721 <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1124224>

- 722 de Kok, T.M.C.M., Driee, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedé, J.J., 2006. Toxicological
723 assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent
724 studies. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 613, 103–122.
725 <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2006.07.001>
- 726 Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon,
727 G., 2012. Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter
728 (PM_{2.50.3}) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial
729 Epithelial Cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919.
730 <https://doi.org/10.1021/tx200529v>
- 731 Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., Garçon,
732 G., 2015. Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air
733 pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial
734 epithelial cells (BEAS-2B). *Environ. Res.* 137, 256–267.
735 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>
- 736 Dietrich, C., 2016. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Stem Cells Int.*
737 2016. Article ID 7943495. <https://doi.org/10.1155/2016/7943495>
- 738 Farina, F., Lonati, E., Milani, C., Massimino, L., Ballarini, E., Donzelli, E., Crippa, L.,
739 Marmiroli, P., Botto, L., Corsetto, P.A., Sancini, G., Bulbarelli, A., Palestini, P., 2019.
740 In Vivo Comparative Study on Acute and Sub-acute Biological Effects Induced by
741 Ultrafine Particles of Different Anthropogenic Sources in BALB/c Mice. *Int. J. Mol.*
742 *Sci.* 20, 2805. <https://doi.org/10.3390/ijms20112805>
- 743 Fortoul, T.I., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Colin-Barenque,
744 L., Bizarro-Nevarés, P., García-Peláez, I., Ustarroz-Cano, M., López-Zepeda, S.,
745 Cervantes-Yépez, S., López-Valdez, N., Meléndez-García, N., Espinosa-Zurutuza, M.,
746 Cano-Rodríguez, G.C.-G. and M.C., 2015. Health Effects of Metals in Particulate
747 Matter. *Curr. Air Qual. Issues.* <https://doi.org/10.5772/59749>
- 748 Fragkos, M., Jurvansuu, J., Beard, P., 2009. H2AX Is Required for Cell Cycle Arrest via the
749 p53/p21 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2828–2840.
750 <https://doi.org/10.1128/MCB.01830-08>
- 751 Garçon, G., Gosset, P., Zerimech, F., Grave-Descampiaux, B., Shirali, P., 2004a. Effect of
752 Fe₂O₃ on the capacity of benzo(a)pyrene to induce polycyclic aromatic hydrocarbon-
753 metabolizing enzymes in the respiratory tract of Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Lett.*
754 150, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.005>
- 755 Garçon, G., Gosset, P., Maunit, B., Zerimech, F., Creusy, C., Muller, J.-F., Shirali, P., 2004b.
756 Influence of iron (⁵⁶Fe₂O₃ or ⁵⁴Fe₂O₃) in the upregulation of cytochrome P4501A1 by
757 benzo[a]pyrene in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Toxicol.* 24,
758 249–256. <https://doi.org/10.1002/jat.979>.
- 759 Ghio, A.J., 1999. Metals Associated with Both the Water-Soluble and Insoluble Fractions of
760 an Ambient Air Pollution Particle Catalyze an Oxidative Stress. *Inhal. Toxicol.* 11,
761 37–49. <https://doi.org/10.1080/089583799197258>
- 762 Gietl, J.K., Lawrence, R., Thorpe, A.J., Harrison, R.M., 2010. Identification of brake wear
763 particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmos.*
764 *Environ.* 44, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.10.016>
- 765 Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E.,
766 Camatini, M., 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of
767 different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro* 24, 29–39.
768 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.013>
- 769 Gualtieri, M., Øvrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini,
770 M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2.5}) cause mitotic
771 arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle

772 organization. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 713, 18–31.
773 <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.011>

774 Gualtieri, M., Grollino, M.G., Consales, C., Costabile, F., Manigrasso, M., Avino, P.,
775 Aufderheide, M., Cordelli, E., Di Liberto, L., Petralia, E., Raschellà, G.,
776 Stracquadiano, M., Wiedensohler, A., Pacchierotti, F., Zanini, G., 2018. Is it the time
777 to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support
778 the shift of in vitro toxicology from the bench to the field. *Chemosphere* 207, 552–
779 564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.130>

780 IARC (Ed.), 2012. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,
781 volume 100 C, arsenic, metals, fibres, and dusts: this publication represents the views
782 and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic
783 Risks to Humans, which met in Lyon, 17 - 24 March 2009. IARC, Lyon.

784 INERIS, 2005. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Guide méthodologique.
785 Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transfert
786 dans les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude n° 66244-DESP-R01, 99p

787 Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2012. Size, source and chemical composition as determinants of
788 toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos. Environ.* 60, 504–526.
789 <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>

790 Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the
791 insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate
792 matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 317–326.
793 <https://doi.org/10.1023/A:1015970023889>

794 Korashy, H.M., El-Kadi, A.O.S., 2004. Differential effects of mercury, lead and copper on the
795 constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated
796 genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 201, 153–172.
797 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.04.011>

798 Kumar, B., Verma, V.K., Kumar, S., Sharma, C.S., Akolkar, A.B., 2018. Benzo(a)Pyrene
799 Equivalency and Source Identification of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
800 in Surface Sediments from Yamuna River. *Polycycl. Aromat. Compd.* 0, 1–16.
801 <https://doi.org/10.1080/10406638.2018.1441878>

802 Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E.M., Alleman, L.Y., Grova, N., Perdrix,
803 E., Appenzeller, B.M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., Garçon, G., 2016.
804 Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human
805 bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM₄. *Environ.*
806 *Pollut.* 218, 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>

807 Leclercq, B., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Riffault, V., Happillon, M., Strecker, A., Lo Guidice,
808 J.-M., Garçon, G., Coddeville, P., 2017a Particulate metal bioaccessibility in
809 physiological fluids and cell culture media: Toxicological perspectives. *Environ Res.*
810 156, 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.029>.

811 Leclercq, B., Platel, A., Antherieu, S., Alleman, L.Y., Hardy, E.M., Perdrix, E., Grova, N.,
812 Riffault, V., Appenzeller, B.M., Happillon, M., Nessler, F., Coddeville, P., Lo-
813 Guidice, J.-M., Garçon, G., 2017b. Genetic and epigenetic alterations in normal and
814 sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air
815 pollution-derived PM_{2.5}. *Environ. Pollut.* 230, 163–177.
816 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.028>

817 Longhin, E., Holme, J.A., Gutzkow, K.B., Arlt, V.M., Kucab, J.E., Camatini, M., Gualtieri,
818 M., 2013. Cell cycle alterations induced by urban PM_{2.5} in bronchial epithelial cells:
819 characterization of the process and possible mechanisms involved. *Part. Fibre Toxicol.*
820 10, 63. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63>

- 821 Longhin, E., Gualtieri, M., Capasso, L., Bengalli, R., Mollerup, S., Holme, J.A., Øvrevik, J.,
822 Casadei, S., Di Benedetto, C., Parenti, P., Camatini, M., 2016. Physico-chemical
823 properties and biological effects of diesel and biomass particles. *Environ. Pollut.* 215,
824 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.015>
- 825 Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa,
826 L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2013. The carcinogenicity of outdoor
827 air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263. [https://doi.org/10.1016/S1470-](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X)
828 [2045\(13\)70487-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X)
- 829 Loxham, M., Morgan-Walsh, R.J., Cooper, M.J., Blume, C., Swindle, E.J., Dennison, P.W.,
830 Howarth, P.H., Cassee, F.R., Teagle, D.A.H., Palmer, M.R., Davies, D.E., 2015. The
831 Effects on Bronchial Epithelial Mucociliary Cultures of Coarse, Fine, and Ultrafine
832 Particulate Matter From an Underground Railway Station. *Toxicol. Sci.* 145, 98–107.
833 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv034>
- 834 Luria, M., Lifschitz, B., Peleg, M., 1989. Particulate sulfate levels at a rural site in Israel. *J.*
835 *Atmospheric Chem.* 8, 241–250. <https://doi.org/10.1007/BF00051496>
- 836 Massoud, R., Shihadeh, Alan.L., Roumié, M., Youness, M., Gerard, J., Saliba, N., Zaarour,
837 R., Abboud, M., Farah, W., Saliba, N.A., 2011. Intraurban variability of PM10 and
838 PM2.5 in an Eastern Mediterranean city. *Atmospheric Res.* 101, 893–901.
839 <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2011.05.019>
- 840 Melki, P.N., Ledoux, F., Aouad, S., Billet, S., El Khoury, B., Landkocz, Y., Abdel-Massih,
841 R.M., Courcot, D., 2017. Physicochemical characteristics, mutagenicity and
842 genotoxicity of airborne particles under industrial and rural influences in Northern
843 Lebanon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 18782–18797. [https://doi.org/10.1007/s11356-](https://doi.org/10.1007/s11356-017-9389-3)
844 [017-9389-3](https://doi.org/10.1007/s11356-017-9389-3)
- 845 Nisbet, I.C., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic
846 hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 16, 290–300.
- 847 Oh, S.M., Kim, H.R., Park, Y.J., Lee, S.Y., Chung, K.H., 2011. Organic extracts of urban air
848 pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in
849 human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat. Res. Toxicol. Environ.*
850 *Mutagen.* 723, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.04.003>
- 851 Prahalad, A.K., Inmon, J., Dailey, L.A., Madden, M.C., Ghio, A.J., Gallagher, J.E., 2001. Air
852 pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in
853 human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity.
854 *Chem. Res. Toxicol.* 14, 879–887. <https://doi.org/10.1021/tx010022e>
- 855 Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with
856 multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713–722.
857 <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.031>
- 858 Putaud, J., Raes, F., Van Dingenen, R., Brüggemann, E., Facchini, M., Decesari, S., Fuzzi, S.,
859 Gehrig, R., Hüglin, C., Laj, P., Lorbeer, G., Maenhaut, W., Mihalopoulos, N., Müller,
860 K., Querol, X., Rodriguez, S., Schneider, J., Spindler, G., Ten Brink, H., Tørseth, K.,
861 Wiedensohler, A., 2004. European aerosol phenomenology-2: chemical characteristics
862 of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *atmos.*
863 *Environ.* 1994 38, 2579–2595.
- 864 Ravindra K., Sokhi R., Van Grieken R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic
865 hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.*,
866 42, 2895-2921. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- 867 Rogers, S., de Souza, A.R., Zago, M., Iu, M., Guerrina, N., Gomez, A., Matthews, J., Baglolle,
868 C.J., 2017. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary
869 miRNA by chronic cigarette smoke exposure. *Sci. Rep.* 7.
870 <https://doi.org/10.1038/srep40539>

- 871 Rynning, I., Neca, J., Vrbova, K., Libalova, H., Rossner, P., Holme, J.A., Gützkow, K.B.,
872 Afanou, A.K.J., Arnoldussen, Y.J., Hrubá, E., Skare, Ø., Haugen, A., Topinka, J.,
873 Machala, M., Mollerup, S., 2018. In Vitro Transformation of Human Bronchial
874 Epithelial Cells by Diesel Exhaust Particles: Gene Expression Profiling and Early
875 Toxic Responses. *Toxicol. Sci.* <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy183>
- 876 Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garçon,
877 G., 2008. Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic
878 aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages
879 in response to airborne particulate matter (PM_{2.5}). *Toxicology* 244, 220–230.
880 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.016>
- 881 Saint-Georges, F., Garçon, G., Escande, F., Abbas, I., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P.,
882 Shirali, P., 2009. Role of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5}) in the occurrence of
883 loss of heterozygosity in multiple critical regions of 3p chromosome in human
884 epithelial lung cells (L132). *Toxicol. Lett.* 187, 172–179.
885 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.02.016>
- 886 Stone, Miller Mark R., Clift Martin J.D., Elder Alison, Mills Nicholas L., Møller Peter,
887 Schins Roel P.F., Vogel Ulla, Kreyling Wolfgang G., Alstrup Jensen Keld, Kuhlbusch
888 Thomas A.J., Schwarze Per E., Hoet Peter, Pietroiusti Antonio, De Vizcaya-Ruiz
889 Andrea, Baeza-Squiban Armelle, Teixeira João Paulo, Tran C. Lang, Cassee
890 Flemming R., 2017. Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An
891 Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ. Health Perspect.* 125,
892 106002. <https://doi.org/10.1289/EHP424>
- 893 Tobiszewski, M., Namiesnik, J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of
894 pollution emission sources. *Environ Pollut* 162, 110-119.
895 <https://doi:10.1016/j.envpol.2011.10.025>
- 896 Totlandsdal, A.I., Cassee, F.R., Schwarze, P., Refsnes, M., Låg, M., 2010. Diesel exhaust
897 particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in
898 human bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 41.
899 <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-41>.
- 900 Verheye, W., 1973. Formation, classification and land evaluation of soils in Mediterranean
901 areas, with special reference to the southern Lebanon. *Form. Classif. Land Eval. Soils*
902 *Mediterr. Areas Spec. Ref. South. Leban.*
- 903 Waked, A., Afif, C., Seigneur, C., 2012. An atmospheric emission inventory of anthropogenic
904 and biogenic sources for Lebanon. *Atmos. Environ.* 50, 88–96.
905 <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.12.058>
- 906 Waples, D.W., 1985. *Geochemistry in petroleum exploration*. International Human Resources
907 Development Corporation, Springer Netherlands. 232p
- 908 Wedepohl, K., 1995. The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta*
909 59, 1217–1232. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00038-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00038-2)
- 910 WHO, 2003. World health organization. *Selected Nitro- and Nitro-oxy-polycyclic aromatic*
911 *hydrocarbons, Environmental health criteria 229*, ISBN 92 4 157229 9, 113p
- 912 WHO, 2018. World health organization. [https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-](https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action)
913 [action](https://www.who.int/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action), accessed the 22nd of august 2019.
- 914
- 915 Xiang, P., He, R.-W., Liu, R.-Y., Li, K., Gao, P., Cui, X.-Y., Li, H., Liu, Y., Ma, L.Q., 2018.
916 Cellular responses of normal (HL-7702) and cancerous (HepG2) hepatic cells to dust
917 extract exposure. *Chemosphere* 193, 1189–1197.
918 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.123>
- 919 Zhang, H., Li, Z., Liu, Y., Xinag, P., Cui, X., Ye, H., Hu, B., Lou, L., 2018. Physical and
920 chemical characteristics of PM_{2.5} and its toxicity to human bronchial cells BEAS-2B

921 in the winter and summer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 19, 317–326.
922 <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700123>
923 Zhang, L., Su, F., Kong, X., Lee, F., Sher, S., Day, K., Tian, Y., Meldrum, D.R., 2016. 1,8-
924 Naphthalimide derivative dyes targeting live cell mitochondria with large stokes shift.
925 *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 17, 1719–1724.
926 <https://doi.org/10.1002/cbic.201600169>
927 Zhou, B., Liang, G., Qin, H., Peng, X., Huang, J., Li, Q., Qing, L., Zhang, L., Chen, L., Ye,
928 L., Niu, P., Zou, Y., 2014. p53-Dependent apoptosis induced in human bronchial
929 epithelial (16-HBE) cells by PM2.5 sampled from air in Guangzhou, China. *Toxicol.*
930 *Mech. Methods* 24, 552–559. <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.951814>
931
932
933

Table captions

Table 1: Elemental, water-soluble ions and total carbon concentrations in PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} collected in the suburb of Beirut (Lebanon).

Table 2: Concentrations of PAH, N-PAH, O-PAH (in µg/g) and PCB, PCDD and PCDF (in ng/g) detected in PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} collected in the southern suburbs of Beirut. The relative percentage of each compound in the corresponding class of organic compounds is also indicated.

Table 3: PAH diagnostic ratios calculated for PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} collected at the southern suburb of Beirut and compared to the bibliography, in order to determine the possible emission sources of PAH.

Table 4: Metabolic activation: gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR), Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor (AHRR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), cytochrome P4501A1 (CYP1A1), cytochrome P4501B1(CYP1B1), epoxide hydrolase 1 (EPHX), glutathione S-transferase alpha 4 (GSTA4) enzymes in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to PM_{2.5-0.3}, organic extract matter (OEM_{2.5-0.3}), non-extractable matter fraction (NEM_{2.5-0.3}) and organic extractable matter of the quasi-ultrafine fraction (OEM_{0.3}) at 3 and 12 µg PM-eq/cm² and positive controls (BaP, 1-NPyr and 9-FluO). These values are depicted as mean values and standard deviations of 3 replicates for controls and 3 replicates for exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. Controls, *: P<0.05).

Table 5: Genotoxicity: Protein expression of ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR), phosphorylated checkpoint kinase 1 (p-CHK-1), phosphorylated checkpoint kinase 2 (p-CHK-2), phosphorylated H2A histone family member X (p-H2AX), total proteins of mouse double minute 2 homolog (MDM2), total protein 21 (P21), phosphorylated protein 53 (p-P53), in BEAS-2B cells exposed 6 and 24 h to PM_{2.5-0.3}, organic extractable matter (OEM_{2.5-0.3}), non-extractable matter fraction (NEM_{2.5-0.3}) and organic extractable matter of the quasi-ultrafine fraction (OEM_{0.3}) at 3 and 12 µg PM-eq/cm² and positive controls (BaP, 1-NPyr and 9-FluO). These values are depicted as mean values and standard deviations of 3 replicates for controls and 3 replicates for exposed cells (Mann–Whitney U-test; vs. Controls, *: P<0.05).

Table 1

Species	PM _{2.5-0.3} (mg/g)	PM _{0.3} (mg/g)
Ca	134	100
NO ₃ ⁻	56	28.8
SO ₄ ²⁻	27.1	7.11
Fe	25.8	12.2
Al	21.4	14.9
Cl ⁻	16.5	21.2
Mg	12.3	17.6
Na	10.7	40.5
K	5.27	6.67
Cu	2.38	2.73
Ti	2.01	1.21
Ba	1.02	0.40
NH ₄ ⁺	1.01	17.4
P	0.58	1.39
Zn	0.40	1.12
Mn	0.30	0.19
Sr	0.23	0.13
Pb	0.15	0.32
Cr	0.14	0.08
V	0.11	0.32
Sn	0.11	0.06
Ni	0.05	0.16
Mo	0.04	0.34
Co	0.14	0.01
As	<DL ^a	0.01
Cd	<DL ^a	0.01
Total carbon	17.5	126

^a DL : Detection limit

Table 2

[Click here to download Table: Table 2-revised.docx](#)

Table 2

	Abbreviation	PM _{2.5-0.3}	Relative %	PM _{0.3}	Relative %
PAH (µg/g)					
Naphthalene	Nap	0.3	0.9	1.1	0.1
Acenaphthylene	Acy	0.1	0.2	0.7	0.1
Acenaphthene	Ace	0.01	0.0	0.2	0.0
Fluorene	Flu	0.1	0.2	0.5	0.1
Phenanthrene	Phe	1.2	3.3	8.8	0.9
Anthracene	Ant	1.7	4.6	1.4	0.1
Fluoranthene	Fla	2.5	6.7	19	1.8
Pyrene	Pyr	2.7	7.3	23	2.3
Benzo[a]Anthracene	BaA	3.4	9.2	64	6.6
Chrysene	Chr	3.6	9.7	51	5.2
Benzo[b]Fluoranthene	BbF	5.6	15.2	173	17.6
Benzo[k]Fluoranthene	BkF	1.5	4.0	38	3.8
Benzo[a]Pyrene	BaP	2.7	7.4	73	7.5
Indeno[1.2.3-c.d]Pyrene	InPy	4.7	12.8	206	21.0
Dibenzo[a,h]Anthracene	DahA	0.4	1.1	22.9	2.3
Benzo[g,h,i]Perylene	BghiP	6.4	17.4	299	30.5
Σ PAH		37	100	980	100
O-PAH^a (µg/g)					
1.8-naphthalic anhydride		2.3	32.9	43	40.6
7H-benz(de)anthracen-7-one	19-BAntO	0.8	11.4	27	25.5
9.10-anthraquinone	9.10-AntQ	2.5	35.7	19	17.9
9-fluorenone	9-FluO	0.7	10.0	3.3	3.1
Benzo(a)fluorenone	BaFluO	0.8	11.4	6.8	6.4
Benz(a)anthracen-7.12-dione	7.12-BaAQ	-	-	6.7	6.3
Σ O-PAH		7.0	100	106	100
N-PAH^b (µg/g)					
2-nitroanthracene	2-Nant	0.2	4.9	4.8	31.2
7-nitrobenz(a)anthracene	7-NBaA	1.1	26.8	2.7	17.5
9-nitroanthracene	9-NAnt	0.05	1.2	1.5	9.7
6-nitrochrysene	6-NChry	0.3	7.3	1.1	7.1
1-nitropyrene	1-NPyr	0.6	14.6	1.0	6.5
1.3-dinitronaphthalene	1.3-DNNap	0.6	14.6	1.2	7.8
5-nitroacenaphthene	5-NAce	0.14	3.4	1.1	7.1
3-nitrophenanthrene	3-NPhe	0.6	14.6	1.1	7.1
2-nitrofluorene	2-NFlu	0.4	9.8	0.9	5.8
Σ N-PAH		4.1	100	15.4	100
Σ PCDD (ng/g)		5.5		25.2	
Σ PCDF (ng/g)		14.0		26.4	
Σ PCB (ng/g)		12.2		15.7	

^a1-naphthaldehyde and phenanthrene-9-carboxyaldehyde were not detected.

^b1-nitronaphthalene; 2-nitrobiphenyl; 1.5-dinitronaphthalene and 1.8-dinitropyrene were not detected.

Table 3:

PAH diagnostic ratios	PM _{2,5-0.3}	PM _{0.3}	Characteristic ratio values and sources		
InPy / (InPy+ BghiP) ^a	0.42	0.41	0.18 Cars	0.62 Wood burning	0.35-0.70 Diesel burning
Flu/(Flu+Pyr) ^a	0.48	0.44	<0.5 Gasoline		>0.5 Diesel
BaP/(BaP+Chry) ^b	0.43	0.59	> 0.35 Vehicular emission		0.2-0.35 Coal combustion
BaP/ BghiP ^a	0.42	0.25	0.5-0.6 Traffic emission		>1.25 Brown coal or lignite
Anth/(Anth+Phe) ^b	0.59	0.14	>0.1 pyrogenic	<0.1 petrogenic	
InPy / BghiP ^a	0.74	0.69	<0.4 Gasoline	~1 Diesel	
Fla/(Fla+Pyr) ^b	0.48	0.44	<0.4 petrogenic	0.4-0.5 Fossil fuel combustion	>0.5 Grass , wood , coal combustion
Fla/Pyr ^b	0.92	0.79	< 0.6 Non traffic emission	> 0.6 traffic emission	
CPAH/TPAH ^a	0.98	0.98		~1 combustion	

^a Ravindra et al., 2008

^b Tobiszewski and Namiesnik, 2012

Table 4
[Click here to download Table: Table 4-revised.docx](#)

		PM _{2.5-0.3}			NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}		BaP	1-NPyr	9-FluO
		Control	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	25 µM	25 µM	25 µM
6 h	<i>AHR</i>	1 ± 0.02	1.96* ± 0.2	2.93* ± 0.31	0.99 ± 0.06	1.06 ± 0.15	1 ± 0.03	1 ± 0.08	1.18 ± 0.25	2.79* ± 0.38	0.9 ± 0.13	4.18* ± 0.41	277.7* ± 63.9
	<i>AhRR</i>	1 ± 0.08	2.10* ± 0.14	2.86* ± 0.88	0.99 ± 0.11	1.43 ± 0.33	1.2 ± 0.30	1.44 ± 0.46	1.19 ± 0.50	2.21* ± 0.60	0.94 ± 0.22	3.15* ± 1.05	61.3* ± 12.9
	<i>ARNT</i>	1 ± 0.02	1.41 ± 0.33	1.91* ± 0.53	1.13 ± 0.15	1.21 ± 0.26	0.9 ± 0.06	0.9 ± 0.13	1.45 ± 0.44	1.66* ± 0.14	1.05 ± 0.2	2.36* ± 0.54	134.8* ± 39.0
	<i>CYP1A1</i>	1 ± 0.07	1.78* ± 0.46	3.65* ± 0.82	1 ± 0.10	1 ± 0.12	0.97 ± 0.01	1.55* ± 0.10	2.18* ± 0.75	1.48 ± 0.33	1.03 ± 0.2	2.28* ± 0.35	37.3* ± 3.71
	<i>CYP1B1</i>	1 ± 0.04	2.26* ± 0.49	4.51* ± 0.83	1.14 ± 0.38	1.5 ± 0.50	0.98 ± 0.04	2.37* ± 0.91	1.59* ± 0.31	2.06* ± 0.15	0.69 ± 0.26	2.55* ± 0.67	46.4* ± 16.1
	<i>EPHX-1</i>	1 ± 0.12	0.99 ± 0.26	1.68 ± 0.58	1 ± 0.28	1.01 ± 0.26	0.87 ± 0.05	0.87 ± 0.06	1.80* ± 0.13	1.75 ± 0.38	0.82 ± 0.06	2.44* ± 0.45	114.5* ± 19.5
	<i>GSTA-4</i>	1 ± 0.09	1.30 ± 0.18	2.59* ± 0.75	0.84 ± 0.09	1.32 ± 0.30	1.21 ± 0.24	1.18 ± 0.10	2.30 ± 0.87	1.71* ± 0.15	0.81 ± 0.20	3.04* ± 1	202.7* ± 34.5
	24 h	<i>AhR</i>	1 ± 0.01	1.31 ± 0.34	4.04* ± 0.8	0.95 ± 0.06	1.03 ± 0.16	0.94 ± 0.03	0.92 ± 0.10	0.43 ± 0.08	1.67* ± 0.22	1.50* ± 0.16	2.48* ± 0.72
<i>AhRR</i>		1 ± 0.04	1.45 ± 0.12	4.13* ± 0.79	0.93 ± 0.14	1 ± 0.20	0.86 ± 0.20	1 ± 0.02	1 ± 0.07	1.64* ± 0.36	2.50* ± 0.93	1.64* ± 0.11	30.3* ± 5.23
<i>ARNT</i>		1 ± 0.05	1.30 ± 0.39	3.56* ± 1.16	0.92 ± 0.14	1.2 ± 0.36	1.17 ± 0.51	1.11 ± 0.34	0.89 ± 0.14	1.98* ± 0.22	1.63* ± 0.10	1.34 ± 0.60	117.0* ± 27.7
<i>CYP1A1</i>		1 ± 0.04	2.59* ± 0.87	7.46* ± 2.70	0.9 ± 0.10	1.49 ± 0.42	1.01 ± 0.12	1.40 ± 0.28	2.45* ± 0.26	4.3* ± 0.97	7.70* ± 1.64	1.86* ± 0.46	18.1* ± 3.14
<i>CYP1B1</i>		1 ± 0.13	1.97* ± 0.29	4.07* ± 0.68	1.19 ± 0.50	1.26 ± 0.41	1.26 ± 0.33	1.23 ± 0.41	1.09 ± 0.16	3.21* ± 1	6.02* ± 1.57	1.67* ± 0.17	17.1* ± 3.16
<i>EPHX-1</i>		1 ± 0.02	1.38 ± 0.32	4.04* ± 1.02	1.05 ± 0.45	1.38 ± 0.38	1.000 ± 0.02	1.24 ± 0.45	1.15 ± 0.43	1.69* ± 0.14	1.70* ± 0.50	1.75* ± 0.26	58.1* ± 9.65
<i>GSTA-4</i>		1 ± 0.04	1.03 ± 0.02	3.62 ± 1.06	0.84 ± 0.18	1.17 ± 0.34	1 ± 0.03	1 ± 0.048	1.16 ± 0.27	1.65* ± 0.19	1.46 ± 0.26	1.29 ± 0.28	94.9* ± 18.6

AHR : aryl hydrocarbon receptor, *AhRR*: Aryl-Hydrocarbon Receptor Repressor, *ARNT*: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, *CYP1A1*: cytochrome P4501A1, *CYP1B1* : cytochrome P4501B1, *EPHX-1* : Epoxide hydrolase 1, *GSTA-4* : Glutathione S-Transferase Alpha 4, **PM_{2.5-0.3}**: fine particulate matter, **NEM_{2.5-0.3}**: Non-extractable matter fraction, **OEM_{2.5-0.3}**: fine organic extractable fraction, **OEM_{0.3}**: quasi-ultrafine organic extractable matter, **BaP** : Benzo[a]pyrene, **1-NPyr**: 1-nitropyrene, **9-FluO** : 9-Fluorenone.

Table 5
[Click here to download Table: Table 5-revised.docx](#)

		PM _{2.5-0.3}		NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}		BaP	1-NPyr	9-FluO	
		Control	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	3 µg PM- éq/cm ²	12 µg PM- éq/cm ²	25 µM	25 µM	25 µM
24 h	ATR	1 ± 0.07	1.07 ± 0.06	1.08 ± 0.18	1.02 ± 0.13	1.05 ± 0.1	0.92 ± 0.07	1.22 ± 0.29	1.014 ± 0.137	1.03 ± 0.13	1 ± 0.224	1.06 ± 0.01	1 ± 0.209
	p-CHK1	1 ± 0.09	0.97 ± 0.16	0.94 ± 0.13	0.94 ± 0.14	0.92 ± 0.07	0.93 ± 0.06	1.369 ± 0.517	1.038 ± 0.179	1.24* ± 0.12	1.23 ± 0.22	1.16 ± 0.08	1.03 ± 0.21
	p-CHK2	1 ± 0.09	1 ± 0.14	1 ± 0.18	0.93 ± 0.13	0.94 ± 0.09	0.95 ± 0.09	1.464 ± 0.622	0.984 ± 0.152	1.08 ± 0.13	1.34* ± 0.19	3.63* ± 0.29	1.04 ± 0.22
	p-H2AX	1 ± 0.13	0.88 ± 0.25	0.756 ± 0.164	0.92 ± 0.12	0.83 ± 0.1	0.95 ± 0.26	1.110 ± 0.383	0.806 ± 0.137	0.85 ± 0.18	1.42* ± 0.08	1.19 ± 0.24	0.83 ± 0.27
	MDM2	1 ± 0.12	1.27* ± 0.11	1.34* ± 0.24	1.02 ± 0.13	1.21* ± 0.1	0.92 ± 0.107	1.251 ± 0.408	0.918 ± 0.131	1.22*	1.24 ± 0.20	1.15 ± 0.03	1.06 ± 0.25
	P21	1 ± 0.10	0.89 ± 0.2	0.55 ± 0.1	0.8 ± 0.07	0.61 ± 0.08	0.88 ± 0.05	1.065 ± 0.215	0.881 ± 0.128	1.60* ± 0.10	0.88 ± 0.15	0.95 ± 0.07	1.17 ± 0.26
	p-P53	1 ± 0.18	1.17 ± 0.16	1.11 ± 0.3	1.11 ± 0.26	1.06 ± 0.12	1.16 ± 0.15	2.53* ± 1.639	1.574* ± 0.384	1.76* ± 0.24	4.29* ± 0.47	1.71* ± 0.09	1.12 ± 0.29
72 h	ATR	1 ± 0.14	0.98 ± 0.19	0.916 ± 0.182	1.14 ± 0.05	0.73 ± 0.13	0.97 ± 0.08	0.74 ± 0.14	0.886 ± 0.077	1.29* ± 0.75	1.1 ± 0.15	0.93 ± 0.33	0.88 ± 0.14
	p-CHK1	1 ± 0.15	1.07 ± 0.19	0.916 ± 0.195	1.26 ± 0.13	1 ± 0.27	1.21 ± 0.11	0.98 ± 0.09	1.37* ± 0.18	5.21* ± 2.85	1.56* ± 0.16	1.24 ± 0.21	1.37 ± 0.32
	p-CHK2	1 ± 0.13	1.05 ± 0.2	0.889 ± 0.161	1.24 ± 0.18	1.01 ± 0.32	1.25 ± 0.10	1.08 ± 0.08	1.83* ± 0.32	4.21* ± 2.31	1.65* ± 0.17	1.31 ± 0.27	1.46 ± 0.37
	p-H2AX	1 ± 0.13	1.36 ± 0.38	1.005 ± 0.224	0.8* ± 0.09	0.49* ± 0.06	0.42* ± 0.03	0.43* ± 0.04	0.74* ± 0.11	1.36* ± 0.73	0.94 ± 0.38	0.65 ± 0.15	0.46 ± 0.11
	MDM2	1 ± 0.12	1.16 ± 0.15	1.054 ± 0.259	1.37* ± 0.20	1.01 ± 0.22	1 ± 0.07	0.79 ± 0.07	0.94 ± 0.16	3.13* ± 1.98	1.03 ± 0.11	0.80 ± 0.193	0.79 ± 0.15
	P21	1 ± 0.24	1.11* ± 0.25	0.912 ± 0.199	1.42 ± 0.29	0.79 ± 0.06	0.86 ± 0.07	0.7 ± 0.15	1.03 ± 0.23	18.49* ± 7.89	1.40 ± 0.20	0.88 ± 0.26	0.94 ± 0.25
	p-P53	1 ± 0.20	0.96 ± 0.39	0.860 ± 0.132	1.67* ± 0.41	0.94 ± 0.17	0.77 ± 0.08	0.89 ± 0.18	2.24* ± 0.33	14.91* ± 9.31	3.51* ± 0.56	1.42* ± 0.17	1.51 ± 0.63

CHK-1: checkpoint kinase 1, CHK-2: checkpoint kinase 2, H2AX: H2A histone family member X, P53: protein 53, ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, MDM2: mouse double minute 2 homolog P21: protein P21, PM_{2.5-0.3}: fine particulate matter, NEM_{2.5-0.3}: Non-extractable matter fraction, OEM_{2.5-0.3}: fine organic extractable fraction, OEM_{0.3}: quasi-ultrafine organic extractable matter, BaP : Benzo[a]pyrene, 1-NPyr: 1-nitropyrene, 9-FluO : 9-Fluorenone.

III. Article 3

Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells.

Soumis à Environmental Pollution

Ce troisième article est consacré à l'évaluation des mécanismes de stress oxydant cellulaire, inflammation, autophagie et apoptose déclenchés dans les cellules Beas-2B exposées aux différents échantillons de particules et extraits préparés (i.e. $PM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$ et $EOM_{0.3}$). La **Figure 42** décrit la démarche appliquée dans cette étude.

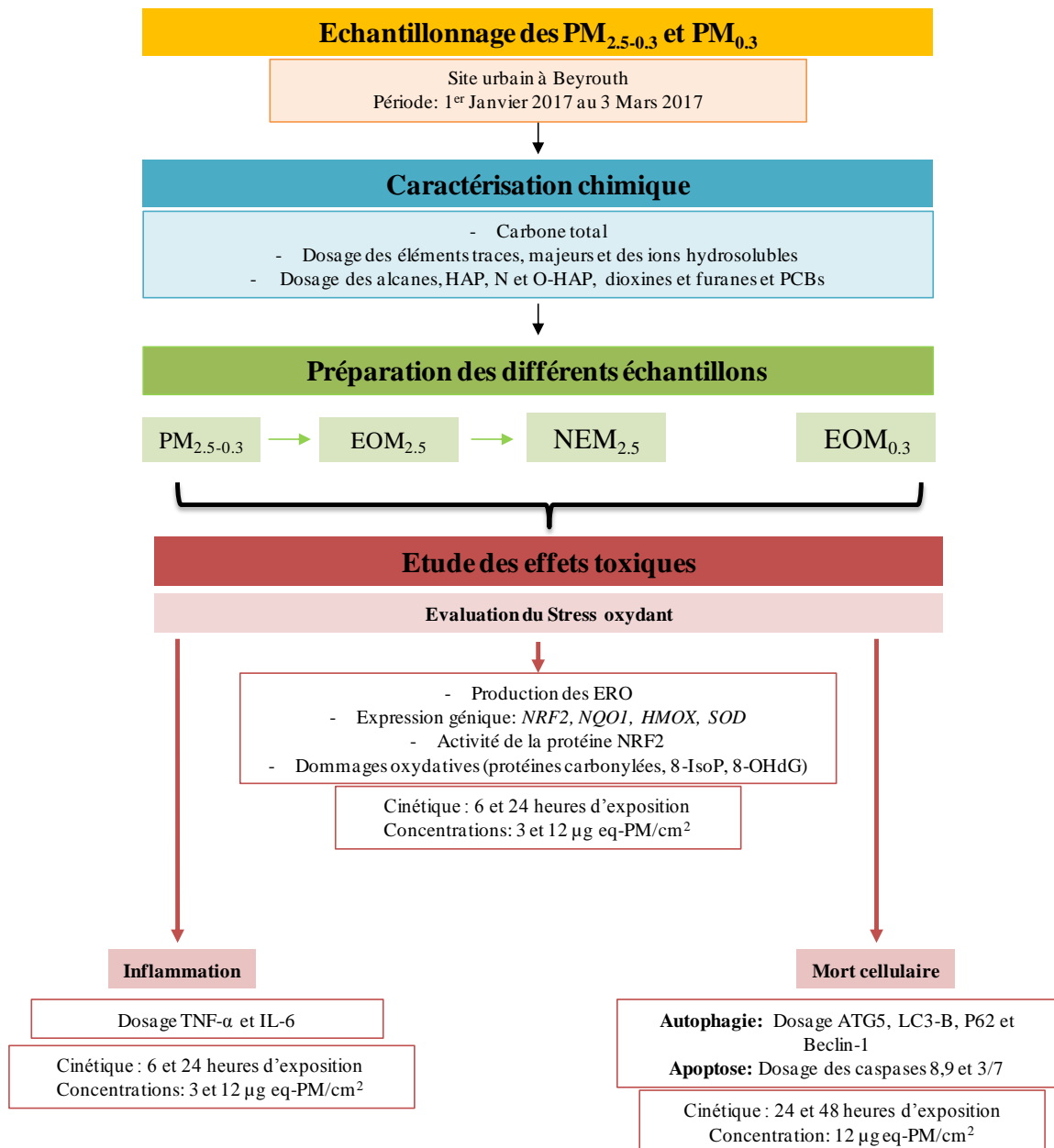


Figure 42 : Démarche expérimentale suivie dans cette étude.

L'exposition des cellules BEAS-2B aux différents échantillons, pendant 6 et 24 heures, à deux concentrations (3 et 12 $\mu\text{g PM-}\text{eq}/\text{cm}^2$) a montré une augmentation dose-dépendante de la production d'ERO dans toutes les conditions. Cependant cette

augmentation était plus importante après 24 h d'exposition des cellules aux $PM_{2.5-0.3}$ et l' $EOM_{0.3}$.

De plus, une augmentation significative de l'expression des gènes NRF2, KEAP-1, HMOX, SOD et NQO1 a été induite par tous les échantillons et principalement par les $PM_{2.5-0.3}$ et l' $EOM_{0.3}$. Cette augmentation dose-dépendante était plus importante après 6 h d'exposition. Un comportement similaire a été observé pour la protéine NRF2 et sa capacité de liaison au niveau de l'ADN.

Par la suite, nous avons montré la capacité des différents échantillons à induire des dommages oxydatifs à l'ADN (en quantifiant la 8-OHdG), aux protéines (en quantifiant le taux de protéines carbonylées) et aux lipides (en quantifiant la 8-isoP). Globalement, les résultats ont montré une induction plus importante après 24 heures d'exposition à la plus forte concentration pour tous les échantillons avec toutefois un effet plus prononcé pour les $PM_{2.5-0.3}$ et l' $EOM_{0.3}$. De plus, l'exposition aux différents échantillons a montré une sécrétion significative des cytokines inflammatoires TNF- α et IL-6 après 6 heures d'exposition uniquement. A noter que cette sécrétion de cytokines inflammatoires était plus marquée après exposition des cellules aux $PM_{2.5-0.3}$, $EOM_{2.5-0.3}$ et $NEM_{2.5-0.3}$ par rapport aux $EOM_{0.3}$.

La génération de dommages cellulaires suite à la survenue d'un stress oxydant et d'une réponse inflammatoire est susceptible de stimuler la voie de l'autophagie afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Aggarwal et al., 2016; Chen et al., 2016; Deng et al., 2013b). Dans notre étude, une diminution significative des marqueurs autophagiques ATG5, Beclin1 et du rapport LC3B-II/ LC3B-I a été observée respectivement après 24 h et 48 h d'exposition à l' $EOM_{0.3}$ indiquant plutôt un blocage de cette voie. Parallèlement, une induction significative du taux de caspases initiatrices (8 et 9) et effectrices (3/7) a été mise en évidence pour toutes les conditions testées. Ces résultats, conjugués à la mise en évidence d'un stress oxydant sévère et de l'induction de la protéine pro-apoptotique p53, semblent indiquer l'échec de la réponse cellulaire via la voie de l'autophagie et l'entrée des cellules endommagées sur la voie de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les différents résultats obtenus au cours de cette étude sont schématisés sur la [Figure 43](#).

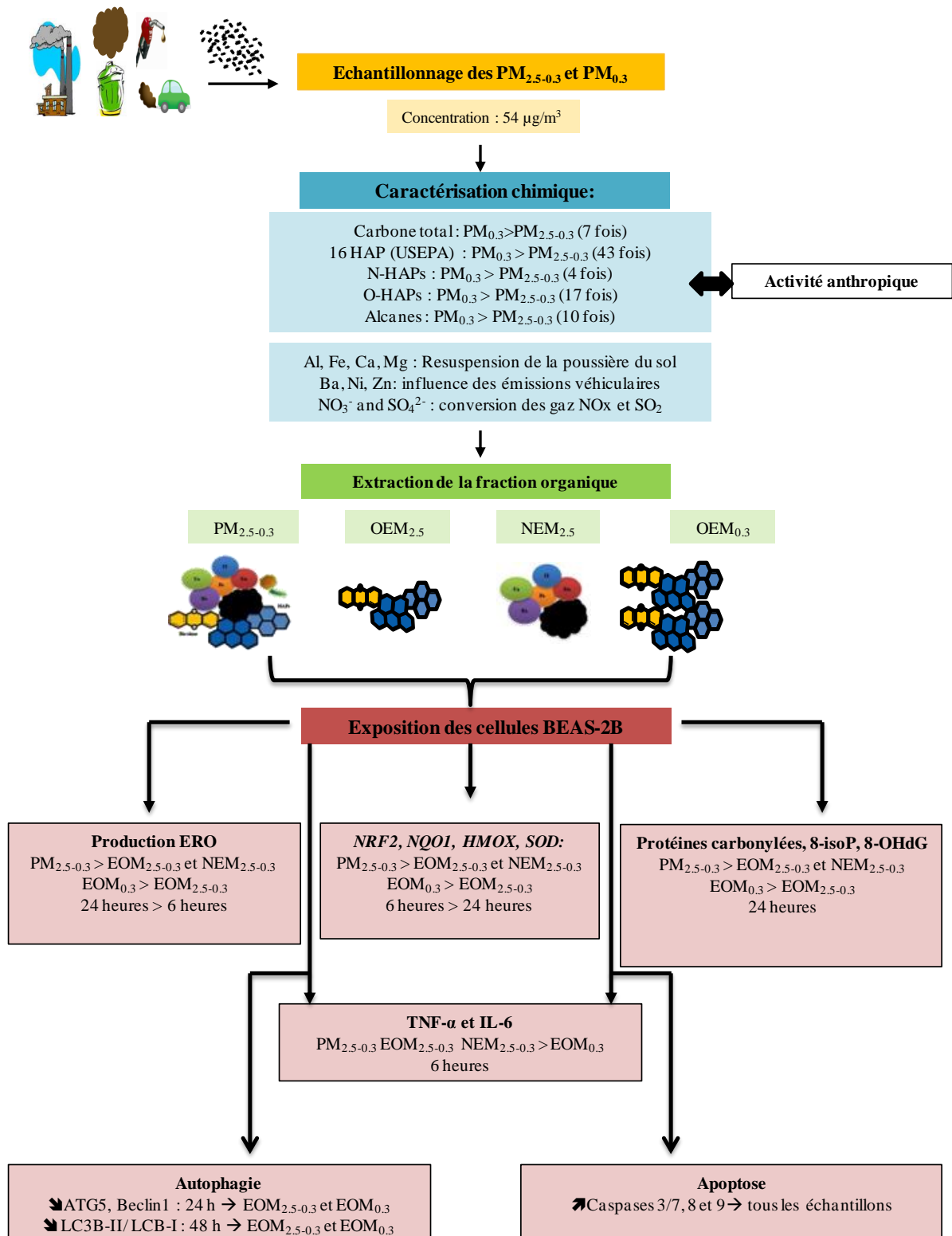


Figure 43 : Représentation schématique des différents résultats obtenus durant l'étude

1 **TOXICOLOGICAL APPRAISAL OF THE CHEMICAL FRACTIONS OF AMBIENT**
2 **FINE (PM_{2.5-0.3}) AND QUASI-ULTRAFINE (PM_{0.3}) PARTICLES IN HUMAN**
3 **BRONCHIAL EPITHELIAL BEAS-2B CELLS**

4
5 **Ghidaa BADRAN^{1,2,3}, Anthony VERDIN¹, Céline GRARE², Imane ABBAS³, Djamel**
6 **ACHOUR², Frédéric LEDOUX¹, Mohamad ROUMIE³, Fabrice CAZIER⁴, Dominique**
7 **COURCOT¹, Jean-Marc LO GUICIDE², Guillaume GARÇON^{2,*}**

8
9 ¹ Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, UCEIV EA4492, FR CNRS
10 3417, Univ. Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, France

11 ² CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPacts de l'Environnement Chimique sur la
12 Santé (IMPECS), Univ. Lille, Lille, France

13 ³ Lebanese Atomic Energy Commission – NCSR, Beirut, Lebanon

14 ⁴ Centre Commun de Mesures, Maison de la Recherche en Environnement Industriel, Univ. du
15 Littoral Côte d'Opale, Dunkerque, France

16
17 *Corresponding Author: Guillaume GARÇON, IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé
18 (IMPECS), Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Univ. Lille, Lille, France; E-mail:
19 guillaume.garcon@univ-lille.fr

24 **ABSTRACT**

25

26 Further toxicological researches are still urgently requested to gain more knowledge about the
27 crucial role played by the organic chemical fraction of ambient particulate matter (PM) in the
28 activation of some classical underlying mechanisms of toxicity within the lung. In this work,
29 human bronchial epithelial BEAS-2B cells were also exposed to fine particles (PM_{2.5-0.3}) and their
30 organic extractable (OEM_{2.5-0.3}) and non-extractable (NEM_{2.5-0.3}) fractions, and to the organic
31 extractable fraction (OEM_{0.3}) of quasi-ultrafine particles (PM_{0.3}) to better investigate their specific
32 toxicological responses. The main objectives of this work were to better evaluate and compare the
33 respective contributions of OEM_{2.5-0.3} and NEM_{2.5-0.3} in the toxicity of PM_{2.5-0.3} and, the respective
34 toxicities of OEM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3}. Using NEM and OEM prepared from physically and
35 chemically characterized PM_{2.5-0.3} and/or PM_{0.3}, we demonstrated that not only PM_{2.5-0.3}, but also
36 its inorganic chemical fraction, NEM_{2.5-0.3}, and organic chemical fraction, OEM_{2.5-0.3} were able to
37 differentially induce harmful ROS overproduction and oxidative damages despite the early
38 activation of the NRF2 signaling pathway, resulting thereby in a moderate secretion of
39 proinflammatory cytokine and progressive apoptosis. However, somewhat surprisingly, only
40 OEM_{2.5-0.3} reduced the autophagy process, thereby contributing to alter the cell homeostasis and
41 functionality. Similar results, even with higher extent, were reported in BEAS-2B cells exposed to
42 OEM_{0.3}, which was particularly enriched with some organic chemicals such as polycyclic aromatic
43 hydrocarbons and their nitrated and oxygenated derivatives. Taken together, these results closely
44 supported the crucial role played by the organic fraction from ambient PM in triggering specific
45 adverse effects within the lungs.

46

47

48 **CAPSULE:** Inorganic and organic chemical fractions from ambient fine and ultrafine particles
49 differentially triggered some critical underlying mechanisms of toxicity within the lungs

50

51 **KEYWORDS:** Fine and quasi-ultrafine particles; extractable and non-extractable chemical
52 fractions; normal human bronchial epithelial BEAS-2B cells; toxicity; underlying mechanisms

53

54 **INTRODUCTION**

55

56 Ambient particulate matter (PM) causes a variety of adverse health effects. Epidemiological
57 evidence supported associations between exposure to high and even lowest levels of ambient PM,
58 on the one hand, and hospital admissions, morbidity and mortality related to chronic inflammatory
59 lung diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and lung cancer,
60 on the other hand (Beelen et al. 2013; Doiron et al. 2019; Hamra et al. 2014; Jerrett et al. 2016;
61 Lelieveld et al. 2019; Raaschou-Nielsen et al. 2016; Loomis et al. 2014). To date, fine (i.e., PM_{2.5})
62 and mainly ultrafine (i.e., PM_{0.1}) particles, generally corresponding to a very complex and
63 heterogeneous chemical mixtures, from natural and anthropogenic sources are reported as having
64 the greatest effects on human health (Abbas et al. 2018). Plenty of experimental studies have
65 already reported the harmful lung effects triggered by ambient PM, mostly through critical
66 underlying mechanisms of toxicity such as oxidative stress-induced airway inflammation (e.g.,
67 Abbas et al. 2010, 2013, 2016, 2019; Billet et al. 2007, 2008; Bocchi et al. 2016; Dergham et al.
68 2012, 2015; Garçon et al. 2006; Gualtieri et al. 2010, 2011; Halonen et al. 2015; Leclercq et al.
69 2016, 2017, 2018; Longhin et al. 2013, 2016, Sotty et al. 2019).

70 To date, a great deal of effort has been done to identify some typical features of *in vitro*
71 toxicological responses which could be closely related to some specific physical and/or chemical
72 characteristics of ambient PM. However, the fact that ambient PM is a complex and heterogeneous,
73 regrettably often poorly described, pollutant greatly complicated this knowledge (Perrone et al.
74 2013). Despite the significant focus of the scientific community about the type of toxicological
75 responses depending on ambient PM, this question is still far from being fully resolved and there
76 is also still an urgent need to fill this knowledge gap. Although the inclusion of the grouping of

77 inorganic constituents has provided useful information on the incremental effects of components
78 and sources of ambient PM, it is worth extending this approach to organic constituents. To this
79 end, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) within fine and quasi-ultrafine particles have been
80 already identified as the major redox-active components, and subsequently, inducers of critical of
81 underlying mechanisms of toxicity. Ambient PM contains a wide variety of organic chemicals,
82 which could, directly or indirectly, through their metabolic activation, possibly participate to the
83 induction of oxidative stress and inflammation oxidative and/or pro-inflammatory events in human
84 bronchial epithelial cell models (Boublil et al. 2013; Dergham et al. 2012, 2015; Longhin et al.
85 2013, 2016; Zhou et al. 2016). Other authors, studying the significant role played by the organic
86 extractable matter (OEM) prepared from ambient PM, evaluated its roles in the overall toxicity but
87 have not yet fully clarified the underlying mechanisms of action (Akhtar et al. 2010; Alessandria
88 et al. 2014; De Brito et al. 2013, Oh et al. 2011, Xiang et al. 2018).

89 Further toxicological researches are therefore urgently requested to gain more knowledge
90 about the crucial role played by the organic chemical fraction in the activation of some classical
91 underlying mechanisms of toxicity. Recently, OEM prepared from PAH and other related chemical
92 compounds containing ambient urban $PM_{2.5-0.3}$ was clearly recognized as triggering oxidative,
93 inflammatory, and genotoxic events: a combination thereof may be the same or different in
94 comparison with those triggered by whole $PM_{2.5-0.3}$. However, further works are still needed in the
95 future to better decipher the critical role of the OEM. It might also be more appropriate to study
96 the toxicity of OEM together with the toxicity of the whole $PM_{2.5-0.3}$, from which they were
97 extracted, and the toxicity of non-extractable matter ($NEM_{2.5-0.3}$, i.e., residual $PM_{2.5-0.3}$ after
98 $OEM_{2.5-0.3}$ extraction), which would allow comparison of their respective adverse effects. In
99 addition, the comparison between the specific toxicities of $OEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$ derived from

100 fine or quasi-ultrafine particles could be very useful in determining the chemical compounds
101 mainly involved. Hence, in this work, using a relevant normal human epithelial bronchial BEAS-
102 2B cell model, we sought to better investigate: (i) the toxicological effects of both OEM_{2.5-0.3} and
103 NEM_{2.5-0.3} in terms of oxidative stress, autophagy and apoptosis, and compare them to that of
104 PM_{2.5-0.3} in its entirety, and (ii) the toxicity of OEM_{0.3} which would lastly be related to that of
105 OEM_{2.5-0.3}.

106

107 **MATERIALS AND METHODS**

108

109 **Chemicals**

110 BEAS-2B cells and all the chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-
111 Quentin Fallavier, France). All the cell culture and molecular biology reagents, dihydroethidium
112 (DHE), 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), High
113 Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Taqman fast advanced Master Mix, Taqman gene
114 expression assays, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, and Single-Channel Dead Cell Apoptosis Kit
115 with Annexin V Alexa Fluor™ 488 and SYTOX™ Green Dyes were provided by ThermoFisher
116 scientific (Villebon-sur-Yvette- France). RNeasy mini Kits were from Qiagen (Courtaboeuf,
117 France). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability, Caspase Glo® 3/7 Assay, Caspase Glo® 8
118 Assay, and Caspase Glo® 9 Assay were from Promega (Charbonnière-les-Bains, France). Highly
119 Sensitive 8-OHdG Check kit was from Gentaur France SARL (Paris, France), and Protein
120 Carbonyl Content Assay Kit and 8-isoprostane ELISA kit from Abcam (Cambridge, UK). Nuclear
121 extract kit and TransAM® NRF2 kit were from Active Motif (La Hulpe, Belgium). MILLIPLEX®
122 MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel- Immunology Multiplex Assays were
123 from Merck-Millipore (St Quentin-en-Yvelines, France). R&D systems (Biotechne SAS, Rennes,
124 France) provided TACS® TdT in situ – Fluorescein System and mouse monoclonal anti-human
125 actin antibody (MAB8929). Cell Signaling Technology (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux,
126 France) provided rabbit monoclonal anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (S7076). Novus
127 Biologicals (Bio-Techne SAS) provided rabbit polyclonal anti-human ATG5 (NB110-53818),
128 rabbit polyclonal anti-human LC3-B antibody (NB100-2220), rabbit polyclonal anti-human beclin

129 antibody (NB500-249), mouse monoclonal anti-human p62/SQSTM1 antibody (H00008878-
130 M01), and goat polyclonal anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (NB7160).

131

132 **Sampling site description, PM sampling methods, PM physicochemical characterization,** 133 **and PM fraction preparation**

134 Sampling site description, sampling methods for PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3}, methods for the
135 determination of the physical and chemical characteristics of PM samples, and methods for the
136 preparation of PM fractions (i.e., NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}) for the toxicological study
137 have been published elsewhere (Badran et al. 2019; see also supplemental data: Figure S1 and
138 Tables S1 and S2). Briefly, PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} were collected by cascade impaction using a high-
139 volume sampler in Beirut, Lebanon. PM_{2.5-0.3} in its entirety was retrieved from superior impaction
140 stages and PM_{0.3} was trapped in the back-up quartz fiber filter. OEM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3} were
141 obtained after dichloromethane extraction of PM samples and solvent change: dichloromethane
142 was replaced by dimethylsulfoxide (DMSO) which does not show any cytotoxicity at the
143 concentration we used.

144

145 **Cell culture and exposure**

146 BEAS-2B cell line (ATCC® CRL-9609™, ECACC, Wiltshire, UK), originally derived from
147 normal human bronchial epithelial cells, was obtained from autopsy of a non-cancerous individual.
148 Cell culture methods have been published elsewhere (Leclercq *et al.* 2017). Briefly, BEAS-2B
149 cells were cultured in 95% humidified air with 5% CO₂ at 37°C in 75 cm² CellBIND® surface
150 plastic flasks (Corning; Sigma-Aldrich) in LHC-9 medium. Before reaching 80% of confluence,
151 cells were subcultured by using 0.25% trypsin/0.53 mM versene solution containing 0.5% (w/v)

152 polyvinylpyrrolidone (Sigma-Aldrich). Medium was refreshed every 2-3 days. All the BEAS-2B
153 cells we used derived from the same cell culture. Just before reaching the confluence (< 80%),
154 BEAS cells were exposed to control solution (LHC-9 with DMSO at 0.5% v/v), or PM_{2.5-0.3},
155 NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3} or OEM_{0.3} to different concentrations ranging from 3 to 96 µg Eq. PM/cm²,
156 with DMSO ≤ 0.5% v/v). The µg Eq. PM/mL unit is in relation with the mass of PM extracted and
157 the final volume of DMSO. Defined volumes of these OEM stock solutions were diluted in the
158 LHC-9 culture medium to expose BEAS-2B cells to the desired concentrations of OEM (also
159 expressed in µg Eq. PM/cm²). After 6, 24 and/or 48 h, aliquots of cell-free culture supernatants,
160 also dedicated to cytotoxicity and inflammatory endpoints, were collected and quickly frozen at -
161 80°C. Adherent cells, also dedicated to for immunofluorescence labelling and flow cytometry
162 analysis, were washed twice with 1mL-aliquots of cold sterile PBS, and immediately fixed. Other
163 adherent cells, also dedicated to oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis
164 endpoints were washed twice with 1mL-aliquots of cold sterile PBS, and quickly frozen at -80°C.

165

166 **Cytotoxicity**

167 Cytotoxicity of the PM fractions (PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3} OEM_{2.5-0.3}, or OEM_{0.3}) was evaluated
168 after cell exposure to increasing concentrations, ranging from 1 to 96 µg Eq. PM/cm², during 6,
169 24 or 72 h through the determination of intracellular ATP concentration (CellTiter-Glo®
170 Luminescent Cell Viability, Promega).

171

172 **Oxidative stress**

173 Oxidative stress was evaluated in BEAS-2B cells, 6 and 24 h after their incubation as controls
174 or their exposure either to PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3} OEM_{2.5-0.3}, or OEM_{0.3}, firstly by the formation of

175 intracellular ROS (HE and carboxy-H2DCFDA). In addition, DNA binding activity of nuclear
176 factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and the associated gene expression of NRF2, Kelch-like
177 ECH-associated protein 1 (KEAP-1), heme oxygenase 1 (HMOX), NAD(P)H quinone
178 dehydrogenase 1 (NQO1), and superoxide dismutase (SOD), one the one hand, and the occurrence
179 of oxidative damage to macromolecules: carbonylated protein (CO-protein), 8-Isoprostane (8-
180 Isop), and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), on the other hand, were studied. BEAS-2B
181 cells treated with Menadione (2.5 mM) served as positive controls. Briefly, either HE (1 μ M) or
182 carboxy-H2DCFDA (1 μ M) was added to control or exposed BEAS-2B cells and incubated at
183 37°C with a kinetic measurement of the fluorescence at $\lambda_{ex} = 495-505$ nm / $\lambda_{em} = 605-615$ nm, and
184 $\lambda_{ex} = 492-495$ nm / $\lambda_{em} = 517-527$ nm, respectively. NRF2 binding activity was studied using
185 TransAM® NRF2 from Active Motif (Leclercq *et al.* 2018). Gene expressions of HMOX, NQO1
186 and SOD were evaluated using quantitative RT-PCR. Briefly, after the total RNA isolation using
187 the RNeasy Kit (Qiagen), the reverse transcription of 1 μ g of total RNA in single-stranded cDNA
188 was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Thereafter, the relative
189 quantitation of the target gene expression was determined using specific Taqman™ gene
190 expression assays (*NRF2*: hs00975961_g1, *KEAP-1*: hs00202227_m1, *HMOX*: Hs01110250_m1,
191 *NQO1*: Hs01045993_g1, *SOD*: hs00162090_m1, *ARN18S*: Hs99999901_s1), a StepOnePlus™
192 Real-Time PCR System, and the Expression Suite Software (ThermoFisher scientific). The relative
193 change in gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ CT method, normalized against endogenous
194 ribosomal 18S. In other respects, CO-protein and 8-IsoP concentrations were determined using
195 Protein Carbonyl Content Assay Kit and 8-isoprostane ELISA kit from Abcam (Leclercq *et al.*
196 2016, 2018). Oxidative DNA adduct 8-OHdG concentrations were studied using a commercially

197 available enzyme immunoassay (Highly Sensitive 8-OHdG Check, Gentaur France SARL), as
198 published elsewhere (Garçon et al. 2006).

199 **Inflammation**

200 Tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), were determined in cell-free culture
201 supernatants of BEAS-2B cells, 6 and 24 h after their incubation as controls or their exposure
202 either to PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, or OEM_{0.3}, using a MILLIPLEX® MAP Human
203 Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel-Immunology Multiplex Assay (Merck-Millipore)
204 according to the manufacturer's instruction (Blasco et al., 2017).

205

206 **Autophagy**

207 Relevant molecules including ATG5, BECN1/Beclin 1, SQSTM1/p62 protein, and
208 microtubule-associated protein 1 light chain 3 b (MAP1LC3B/LC3B), currently described as
209 critical hallmarks of autophagosome formation, were considered to study autophagy in BEAS-
210 2B cells, 24 and 48 h after their incubation as controls or their exposure either to PM_{2.5-0.3}, NEM<sub>2.5-
211 0.3</sub> OEM_{2.5-0.3}, or OEM_{0.3} through. BEAS-2B cells treated with Rapamycin (10 μ M) served as
212 positive controls. Protein extracts (20 μ g) were prepared from BEAS-2B cells using protease and
213 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)-supplemented RIPA lysis and extraction buffer
214 (ThermoFisher scientific). After their separation by electrophoresis on SDS-PAGE gels, their
215 transfer on nitrocellulose membranes, and their blockage in 5% (m/v) non-fat dry milk for 45 min,
216 target proteins were incubated firstly with primary antibodies (rabbit polyclonal anti-human
217 ATG5, rabbit polyclonal anti-human LC3-B antibody, rabbit polyclonal anti-human Beclin
218 antibody, mouse monoclonal anti-human p62/SQSTM1 antibody (Novus Biologicals); mouse
219 monoclonal anti-human actin antibody (R&D Systems) overnight at 4°C, secondly for 1 h with

220 secondary antibodies (rabbit monoclonal anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling
221 Technology); goat polyclonal anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Novus Biologicals) at room
222 temperature, and at last with ECL prime Western Blotting Detection reagent (GE Healthcare).
223 Chemiluminescence was recorded by Fusion FX Spectra (Vilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée,
224 France.

225

226 **Apoptosis**

227 Apoptosis was investigated in BEAS-2B cells, 24 and 48 h after their incubation as controls
228 or their exposure either to PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3} OEM_{2.5-0.3}, or OEM_{0.3} through the determination of
229 the activities of some initiator (8, 9) or effective (3/7) caspases, and classical TdT-mediated dUTP
230 Nick-End Labeling (TUNEL) and Annexin-V assays. BEAS-2B cells treated with Staurosporine
231 (1 µM) served as positive controls. Caspase-3/7, 8, and 9 activities in BEAS-2B cells were studied
232 using commercially available luminescent assays (i.e., CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability,
233 Caspase Glo® 3/7 Assay, Caspase Glo® 8 Assay, and Caspase Glo® 9 Assay, Promega) according
234 to the manufacturer's recommendations (Leclercq et al. 2018). TACS® TdT in situ – Fluorescein
235 System (R&D systems), a classic TUNEL assay, was used according to the manufacturer's
236 recommendations before cell observation using an EVOS® FL Cell Imaging System
237 (ThermoFisher scientific). Single-Channel Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa
238 Fluor™ 488 and SYTOX™ Green Dyes (ThermoFisher scientific) was used as recommended by
239 the manufacturer to detect the externalization of phosphatidylserine in apoptotic cells using
240 recombinant annexin V conjugated to green-fluorescent Alexa Fluor™ 488 dye and dead cells
241 using SYTOX™, before cell analysis using an Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer
242 (Thermo-Fisher). Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 647 Flow Cytometry Assay Kit

243 (ThermoFisher scientific), based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) as a nucleoside analog to
244 thymidine and to be incorporated into DNA during active DNA synthesis, was used to measure
245 the cell ability to proliferate as a fundamental method for assessing cell health. Detection is based
246 on a click reaction, a copper catalyzed covalent reaction between a picolyl azide and an alkyne. In
247 this application, the alkyne is found in the ethynyl moiety of EdU, while the picolyl azide is
248 coupled to Alexa Fluor™ 647 dye, and monitor using an Attune™ NxT Acoustic Focusing
249 Cytometer (Thermo-Fisher) for determining the percentage of S-phase cells in the population.

250

251 **Statistical analysis**

252 Results were expressed as mean values and standard deviations. For each incubation time,
253 results from BEAS-2B cells exposed either to $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, or $OEM_{0.3}$ at their
254 different concentrations or to positive controls were compared to those obtained from negative
255 controls (i.e., non-exposed). Thereafter, significant difference between results from BEAS-2B
256 cells exposed either to $NEM_{2.5-0.3}$ or to $OEM_{2.5-0.3}$ versus $PM_{2.5-0.3}$, and to $OEM_{0.3}$ versus $OEM_{2.5-0.3}$
257 were researched. Statistical analyses were performed by the non-parametric Mann-Whitney U-
258 test with correction for multiple comparisons (Software: SPSS for windows). Significant
259 differences were reported with p values < 0.05 .

260

261 RESULTS AND DISCUSSION

262

263 Despite the large number of *in vitro* approaches available in the respiratory toxicology
264 literature, researchers are still far from having a comprehensive, detailed mechanistic explanation
265 of the causal relationship between particle composition and induced adverse health effects
266 (Longhin et al. 2016). Indeed, there is still a lack of knowledge about the specific chemical fraction
267 within ambient PM, which could be mainly responsible of its adverse effects on human health. In
268 this work, human bronchial epithelial BEAS-2B cells were exposed to PM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3} and
269 NEM_{2.5-0.3} fractions as well as to OEM_{0.3}.

270

271 **PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}-induced cytotoxicity**

272 As shown in Figure S2, PM_{2.5-0.3} significant decreases of intracellular ATP concentration in
273 BEAS-2B cells were reported after 6, 24 and 72 h of exposure, from the dose of 6 µg/cm². Almost
274 a similar profile of intracellular ATP concentration was observed in BEAS-2B cells after their
275 exposure to NEM_{2.5-0.3}. In contrast, both OEM_{2.5-0.3} and particularly OEM_{0.3} significantly altered
276 intracellular ATP concentration in BEAS-2B cells only for the highest doses, almost since 48 µg
277 Eq. PM/cm². The dose- and/or time-dependent cytotoxicity of PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and
278 OEM_{0.3} observed in BEAS-2B cells allowed to choose two concentrations (i.e., 3 and 12 µg Eq.
279 PM/cm²) among the lowest reported to give harmful effects whilst limiting a massive regulated
280 cell death, and the kinetic (from 6 to 48 h) to apply for the further study of toxicological endpoints
281 (Abbas et al. 2019; Badran et al., 2019; Gualtieri et al. 2010, 2011; Leclercq et al. 2018; Longhin
282 et al., 2013, 2016; Platel et al. 2019; Sotty et al. 2019).

283

284 **PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}-induced oxidative stress**

285 Oxidative stress is often considered to be the primary critical underlying mechanism induced
286 by ambient PM. Accordingly, Figure 1 showed the intracellular overproduction of ROS in BEAS-
287 2B cells 6 and 24 h after their exposure to either PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}. HE
288 fluorescence intensity significantly increased in a dose-dependent manner in BEAS-2B cells after
289 their exposure to NEM_{2.5-0.3} and OEM_{2.5-0.3}, and more markedly PM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3}. Because of
290 its desirable quality of passive diffusion into cells, as well as its high reactivity, HE is also known
291 to be the most specific fluorescent probe for detecting cytosolic superoxide (Roesslein et al, 2013;
292 Wojtala et al. 2014). Almost similar results were observed for the intensity of fluorescence emitted
293 by carboxy-H₂DCFDA, with the highest intensity detected in BEAS-2B cells 24 hours after
294 exposure to PM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3}. The oxidation of H₂DCF is often referred to as a hydrogen
295 peroxide detection probe for the measurement of hydrogen peroxide in intact cells; however, the
296 range of ROS detected by this probe is much broader (Wojtala et al. 2014). Accordingly, both
297 PM_{2.5-0.3} and NEM_{2.5-0.3} contained inorganic elements (see also Table S1); among them, Al, Cr,
298 Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti and Zn are generally associated with redox reactions. In addition, the
299 overproduction of ROS could be related to the organic species (i.e., PAH, O-PAH, and N-PAH)
300 found within PM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and rather OEM_{0.3} (see also Table S1). Badran et al. (2019)
301 recently reported that PM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3} were capable of significantly activating the
302 AhR signaling pathway, thereby triggering transcription levels of *CYP1A1* and *1B1* genes, which
303 are poorly or not at all expressed in BEAS-2B cells. Although metabolic activation is generally
304 beneficial in helping lung cells to reduce the potential toxicity of inhaled pollutants, it sometimes
305 converts harmless substances into highly biologically reactive electrophilic metabolites, thereby
306 contributing to the overproduction of ROS (Saint-Georges et al. 2008, 2009). According to the

307 literature, PM_{10} and $PM_{2.5}$, representative of urban background air pollution, diesel exhaust PM
308 and wood smoke, because of their relatively high levels of PAH, were all able to significantly
309 activate the AHR signaling pathway and/or generate oxidative stress conditions in BEAS-2B cells
310 (Gualtieri et al. 2011; Longhin et al. 2013)., In addition, OEM containing some aliphatic
311 chlorinated hydrocarbons, PAH/alkylated derivatives and nitro-PAH/ketones/quinones were
312 reported as inducing CYP1A1-dependent EROD activity through activation of the AHR signaling
313 pathway, which is specifically related to the critical role of the organic chemical fraction of
314 ambient PM (Oh et al. 2011). As shown in Figure 1, as a consequence of ROS overproduction, the
315 gene expression and the binding activity of NRF2 were significantly increased in BEAS-2B cells
316 after their exposure to $NEM_{2.5-0.3}$ or $OEM_{2.5-0.3}$, and more markedly to $PM_{2.5-0.3}$ or $OEM_{0.3}$. Both
317 these changes were higher at 6 than 24 h. Accordingly, several members of the NRF2 signaling
318 pathway (i.e., *KEAP-1*, *HMOX*, *NQO1*, and *SOD*) were significantly triggered mostly after 6 rather
319 24 h, by the exposure to $NEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{2.5-0.3}$, and particularly $PM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{0.3}$ (Figure
320 2). Because of its key role as a primary regulator of cellular redox homeostasis, NRF2 is well
321 equipped to counteract the cytosolic overproduction of ROS and is essential for maintaining redox
322 balance in the cell (Wardyn et al. 2015). In response to the exposure to oxidants or electrophiles,
323 NRF2 accumulates in the nucleus, where it binds to the ARE in upstream regulatory regions of
324 genes encoding NRF2 targets. Among them, antioxidant enzymes, proteins involved in the
325 metabolism and clearance of xenobiotics, protection against metal toxicity, inhibition of
326 inflammation, repair and elimination of damaged proteins, and other transcription and growth
327 factors are generally described (Suzuki et al. 2016). However, under all exposure conditions, we
328 reported somewhat surprisingly only a relatively low activation of NRF2 transcription factor in
329 BEAS-2B cells 24 h after their exposure, thereby suggesting the possible occurrence of NRF2

330 relocalization, binding inactivation or degradation in cells even under stress. Oxidative damage to
331 target macromolecules occurred therefore through the dose- and time-dependent formation of 8-
332 OHdG, CO-protein, and 8-IsoP (Figure 3). Remarkably, the highest concentrations of oxidative
333 damage in BEAS-2B cells were generally reported after their exposure to $PM_{2.5-0.3}$, and
334 interestingly $OEM_{0.3}$ rather than $NEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{2.5-0.3}$. Overall, these results clearly indicated
335 the occurrence of a remarkable cytosolic oxidative stress, which, because of the inability of the
336 activated NRF2 signaling pathway to totally counteract the ROS production, trigger harmful
337 oxidative damage to critical macromolecules after the exposure to $PM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$, and
338 $NEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{2.5-0.3}$, to a lesser extent. Oxidative damage to DNA, proteins and/or lipids can
339 significantly disrupt the cell homeostasis through the inorganic- and organic chemical-catalyzed
340 overproduction of ROS and cellular internalization, contributing to the modulation of gene
341 expression or DNA mutation, protein alteration with loss of function, and oxidative degradation
342 of the lipid membrane with loss of integrity and fluidity (Abbas et al. 2019; Dergham et al., 2012,
343 2015; Garçon et al., 2006; Gualtieri et al., 2010, 2011; Leclercq et al. 2016, 2017, 2018; Longhin
344 et al. 2013, 2016).

345

346 **$PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{0.3}$ -induced cytokine secretion**

347 While NRF2, as an anti-inflammatory, can modulate NF- κ B binding activity, NF- κ B can, as
348 a self-starter, modulate NRF2 transcription and activity having thereby positive or negative effects
349 on the expression of its target gene expression (Fischer et al. 2015; Wardyn et al. 2015; Suzuki et
350 al. 2016). Accordingly, as shown in Figure S3, only TNF- α and IL-6 were significantly secreted
351 by BEAS-2B cells 6 and 24 h after their exposure to $PM_{2.5-0.3}$, and mainly 6 h after their exposure
352 to $NEM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{0.3}$. However, it is noteworthy that there was only limited

353 secretion of TNF- α and IL-6 by exposed BEAS-2B cells, as compared with other results (Abbas
354 et al. 2019; Dergham et al., 2012, 2015; Garçon et al., 2006; Gualtieri et al., 2010, 2011; Leclercq
355 et al. 2018; Longhin et al. 2013, 2016). The proinflammatory properties of various types of ambient
356 PM have already been largely described (Boulbil et al. 2013; Ghio et al. 2013; Gualtieri et al. 2010,
357 2011; Leclercq et al. 2016, 2018; Longhin et al. 2013; Loxham et al. 2015; Sotty et al. 2019). PAH
358 and other related chemicals have been generally shown to trigger early oxidative and inflammatory
359 responses in human bronchial epithelial cell models, including BEAS-2B cells (Boublil et al. 2013;
360 Deng et al. 2017; Dergham et al. 2012, 2015; Garçon et al. 2006; Gualtieri et al. 2010, 2011;
361 Leclercq et al. 2018; Longhin et al. 2013, 2016; Zhou et al. 2016). A remarkable relationship has
362 been reported between the contents of redox-active compounds (e.g., metals, PAH) within ambient
363 PM and the proinflammatory response occurring within lung cells, which might closely rely on
364 the regulation of NF- κ B (Lodovici and Bigagli, 2011). In addition, the activation of the NF- κ B
365 signaling pathway thereafter leading to the important release of proinflammatory cytokines have
366 been well-documented in human airway epithelial cells after their exposure to ambient PM-
367 containing redox-active compounds, which were also capable of functioning as second messengers
368 to trigger the NRF2 and NF- κ B signaling pathways (Schuliga et al. 2015; Zhou et al. 2016, 2017).
369 Other authors contributing to decipher the underlying mechanisms of toxicity of PM₁₀ and PM_{2.5}
370 in BEAS-2B cells reported that PM_{2.5}-induced IL-6 secretion appeared to be activated before IL-
371 8 secretion, and did not increase beyond 24 h in contrast to PM₁₀-induced IL-6 secretion.

372

373 **PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}-induced autophagy**

374 To go further in this original work and to contribute to fill the knowledge about the harmful
375 effects of the exposure to PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3} on BEAS-2B cell

376 homeostasis and functionality, autophagy was thereafter studied. Indeed, mounting evidences
377 further suggest that long-lasting oxidative stress may help to cell adaptation to the stress by limiting
378 the oxidative damage, and although the molecular mechanisms underlying these changes remain
379 unknown, autophagy is part of the adaptive response (Deng et al 2017). Autophagy ensures many
380 critical functions inside cells, from resistance to starvation to healthy housekeeping and quality
381 control of defective proteins and organelles (Deng et al 2017). It has now been well-established
382 that the autophagy machinery is closely involved in extensive crosstalk with several chronic
383 inflammatory lung diseases, including asthma and COPD, and several, if not all forms of regulated
384 cell death (RCD), either by hyperactivation or by inhibition of the autophagy flow (Racanelli et al.
385 2016; Napoletano et al. 2019; Zhou et al. 2016). As shown in Figure 4, the possible alteration of
386 autophagy in BEAS-2B cells 24 and 48 h after their exposure to either $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$,
387 $OEM_{2.5-0.3}$, or $OEM_{0.3}$ was studied through the evaluation of some critical molecules:
388 BECN1/Beclin 1, ATG5, SQSTM1/p62 protein, and MAP1LC3B/LC3B. Although no significant
389 change of P62 protein was observed, significant decreases of ATG5 and Beclin1 were obtained in
390 BEAS-2B cells 24 h after their exposure to $OEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$, thereby supporting autophagy
391 reduction. Autophagosome formation highly required two ubiquitin-like conjugation systems,
392 LC3B and ATG5-12, and is upregulated by the autophagy protein, Beclin (An et al. 2019). The
393 conversion of unconjugated cytosolic form, LC3-I, to autophagosomal membrane-associated
394 phosphatidylethanolamine-conjugated form, LC3-II is a critical hallmark of autophagosome
395 formation. Both the forms of LC3B were also determined and the LC3B-II/LC3B-I protein ratio
396 appeared significantly reduced in BEAS-2B cells only 48 h after their exposure to both the OEM.
397 Overall, the study of autophagy closely supported differential responses of whole PM or NEM
398 towards organic enriched fractions (i.e., $OEM_{2.5-0.3}$ and rather $OEM_{0.3}$). In agreement with our data

399 suggesting a reduction of autophagy, an alteration of autophagy has been identified and described
400 by Bodas et al. (2016) as a critical underlying mechanism involved in the pathogenesis of COPD-
401 emphysema induced by cigarette smoke and cigarette vapor. In contrast, the essential roles of
402 autophagy in regulating inflammation and mucus hyperproduction induced by PM containing
403 environmentally persistent free radicals was clearly supported by Chen et al. (2016). In addition,
404 they explained that autophagy is required for ambient PM-induced epithelial lesions of the
405 respiratory tract, and that inhibition of autophagy has some benefit for particle-induced airway
406 inflammation and mucus hyperproduction. Accordingly, Deng et al. (2013, 2014, 2017) further
407 investigating the biological effects of PM_{2.5} on autophagy in A549 cells, clearly supported the
408 possibility that PM_{2.5}-induced oxidative stress probably plays a key role in autophagy, which may
409 contribute to PM_{2.5}-induced impairment of pulmonary function. A pivotal role of autophagy in
410 mediating ambient PM-induced epithelial lesions of the respiratory tract was supported by Xu et
411 al. (2017). Recently, they showed that the exposure to ambient PM activated autophagy in human
412 bronchial epithelial cells and further illustrated that autophagy inhibitors suppressed the
413 inflammatory responses through the inhibition of NF-κB signaling pathway. Taken together, our
414 results also supported the intriguing occurrence of a specific autophagy-impairment as a critical or
415 even beneficial mechanism triggered during OEM-mediated toxicity. There is therefore an
416 apparent discrepancy between our original results supporting the lack of clear effects (i.e., PM_{2.5}-
417 _{0.3}, NEM_{2.5-0.3}) or the dysregulation (i.e., OEM_{2.5-0.3} and OEM_{0.3}) of the autophagy process possibly
418 for the benefit of apoptosis activation, and those reported by other authors, suggesting the clear
419 activation of autophagy process following the exposure to ambient PM.

420

421 **PM_{2.5-0.3}, NEM_{2.5-0.3}, OEM_{2.5-0.3}, and OEM_{0.3}-induced apoptosis**

422 Recent data suggested divergent cells responses towards ambient PM exposure resulting in
423 different cell death types (i.e., apoptosis, autophagy, and necrosis) (Peixoto et al. 2017). To go
424 further, apoptosis was also investigated. Figure 5 shows the specific activities of some of the
425 critical caspases closely involved in both the cell death receptor (extrinsic) and the mitochondrial
426 (intrinsic) pathways of apoptosis. The activities of the initiator caspases 8 and 9, on the one hand,
427 and the effective caspases 7/8, on the other hand, showed almost similar changes in BEAS-2B
428 cells 24 and 48 h after their exposure either to $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, or $OEM_{0.3}$, thereby
429 supporting the progressive occurrence of apoptotic events. However, as shown by Figures 6 and
430 7, both TUNEL and Annexin-V immunostaining of BEAS-2B cells, on the one hand, and cell
431 cycle phases of these cells, on the other hand, indicated rather no clear morphological
432 characteristics of a regulated cell death by apoptosis, even after 48 h of exposure. However, An et
433 al. (2019), studying the critical interplays between oxidative stress, autophagy and apoptosis
434 induced by oxidized black carbon, reported that it was capable to activate each of them in a dose-
435 dependent manner. Other authors reported the proapoptotic effects of ambient $PM_{2.5}$ within various
436 human epithelial bronchial cell models, including BEAS-2B cells, according to the specific
437 exposure conditions (Boublil et al. 2013; Gualtieri et al. 2011; Leclercq et al. 2018; Longhin et al.
438 2013; Lee et al. 2019). However, Peixoto et al. (2017) recently published relevant data about the
439 relationships between the exposure to ambient PM and the underlying mechanisms related to cell
440 death, with a particular attention devoted to the pivotal role played by the induced oxidative stress
441 in the determination of cell fate. When the levels of ROS were overpowering, the cellular fate was
442 progressively directed toward cell death, as possibly occurring here, after BEAS-2B cell exposure
443 to $PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, $OEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{0.3}$. Overall, although both $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$
444 also triggered some underlying mechanisms of toxicity, their combination thereof may be different

445 compared with those induced by whole PM. Indeed, only $OEM_{2.5-0.3}$ reduced the autophagy
446 process, thereby contributing to alter the cell homeostasis and functionality. Similar results, even
447 with higher extent, were reported in BEAS-2B cells exposed to $OEM_{0.3}$, which is particularly rich
448 in organic chemical, as compared to $OEM_{2.5-0.3}$, thereby supporting the critical role of the organic
449 fraction, together with the inorganic one, in the PM-induced toxicity.

450

451 **CONCLUSIONS**

452

453 In order to increase the knowledge about the specific chemical fraction within ambient PM,
454 which could be mainly responsible of its harmful effects within the lungs, the main objectives of
455 this work were to better evaluate and compare the respective contributions of $OEM_{2.5-0.3}$ and
456 $NEM_{2.5-0.3}$ in the toxicity of $PM_{2.5-0.3}$ and, the respective toxicities of $OEM_{2.5-0.3}$ and $OEM_{0.3}$, in a
457 relevant normal human bronchial epithelial BEAS-2b cell model. Here, we clearly demonstrated
458 that whole $PM_{2.5-0.3}$ and both its inorganic and inorganic chemical fractions were able to
459 differentially induce some underlying mechanisms of toxicity. Moreover, only $OEM_{2.5-0.3}$ reduced
460 the autophagy process, thereby contributing to alter the cell homeostasis and functionality. Similar
461 results, even with higher extent, were reported in BEAS-2B cells exposed to $OEM_{0.3}$, which was
462 particularly enriched with some organic chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons and
463 their nitrated and oxygenated derivatives. Hence, to better decipher the possible critical effect of
464 ambient PM and its related fractions onto the autophagy process and its related regulated cell death,
465 future works are needed considering the characteristics of the different PM-exposed models,
466 including the cell culture line, PM and related fraction composition, and the interaction of the
467 different cell types in *in vivo* models.

468

469 **REFERENCES**

- 470
- 471 Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, Billet S, Verdin A, Gosset P, Mulliez P, Shirali P (2010)
- 472 Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after *in vitro* short-term
- 473 exposure to air pollution PM_{2.5}. Chem Biol Interact 188:558-565
- 474 Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, André V, Gosset P, Billet S, Le Goff J, Verdin A, Mulliez P,
- 475 Sichel F, Shirali P (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter
- 476 (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. J Appl
- 477 Toxicol 33:109-119
- 478 Abbas I, Verdin A, Escande F, Saint-Georges F, Cazier F, Mulliez P, Courcot D, Shirali P, Gosset
- 479 P, Garçon G. (2016) In vitro short-term exposure to air pollution PM_{2.5-0.3} induced cell cycle
- 480 alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. Env Res. 147, 146-158.
- 481 Abbas I., Badran G., Verdin A., Ledoux F., Roumié M., Courcot D., Garçon G. (2018) Polycyclic
- 482 aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity.
- 483 Environ. Chem. Lett. 16, 439–475.
- 484 Abbas I, Badran G, Verdin A, Ledoux F, Roumie M, Lo Guidice JM, Courcot D, Garçon G. (2019)
- 485 In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial
- 486 epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response,
- 487 genotoxicity, and cell cycle deregulation. Environ Res. 171, 510-522.
- 488 Akhtar US, McWhinney RD, Rastogi N, Abbatt JP, Evans GJ, Scott JA. (2010) Cytotoxic and
- 489 proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the
- 490 production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. Inhal
- 491 Toxicol. 22 Suppl 2, 37-47.

492 Alessandria L, Schilirò T, Degan R, Traversi D, Gilli G. (2014) Cytotoxic response in human lung
493 epithelial cells and ion characteristics of urban-air particles from Torino, a northern Italian city.
494 Environ Sci Pollut Res Int. 21(8), 5554-5564.

495 An J, Zhou Q, Wu M, Wang L, Zhong Y, Feng J, Shang Y, Chen Y. (2019) Interactions between
496 oxidative stress, autophagy and apoptosis in A549 cells treated with aged black carbon. Toxicol
497 In Vitro. 54, 67-74.

498 Badran G, Ledoux F, Verdin A, Abbas I, Roumie M, Genevray P, Landkocz Y, Lo Guidice JM,
499 Garçon G, Courcot D. (2019). Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects
500 of organic extractable and non-extractable matter fractions. Chemosphere (in press)

501 Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M (2013) Effects of long-term exposure to air pollution
502 on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE
503 project. The lancet 383:785-795

504 Blasco H, Garçon G, Patin F, Veyrat-Durebex C, Boyer J, Devos D, Vourc'h P, Andres CR, Corcia
505 P (2017) Panel of oxidative stress and inflammatory biomarkers in ALS: a pilot study, Can J
506 Neurol Sci 44(1):90-95

507 Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Courcot, D., Aboukais, A., and Shirali,
508 P. (2007) Ambient particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic
509 activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). Environ. Res. 105, 212-
510 223.

511 Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., Andre ,V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F.,
512 Sichel, F., Shirali, P., and Garçon, G. (2008) Genotoxic potential of polycyclic aromatic
513 hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549
514 cells. Cancer Lett. 270, 144-155.

515 Bodas M, Van Westphal C, Carpenter-Thompson R, K Mohanty D, Vij N. (2016) Nicotine
516 exposure induces bronchial epithelial cell apoptosis and senescence via ROS mediated
517 autophagy-impairment. *Free Radic Biol Med.* 97, 441-453.

518 Bocchi C, Bazzini C, Fontana F, Pinto G, Martino A, Cassoni F. (2016) Characterization of urban
519 aerosol: seasonal variation of mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5}, PM₁ and semi-volatile
520 organic compounds. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 807, 16-23.

521 Boulil L, Assémat E, Borot M,C, Boland S, Martinon L, Sciare J, Baeza-Squiban A (2013)
522 Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium *in vitro* to study
523 the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in vitro* 27:533-542.

524 Chen ZH, Wu YF, Wang PL, Wu YP, Li ZY, Zhao Y, Zhou JS, Zhu C, Cao C, Mao YY, Xu F,
525 Wang BB, Cormier SA, Ying SM, Li W, Shen HH. (2016) Autophagy is essential forultrafine
526 particle-induced inflammation and mucus hyperproduction in airway epithelium. *Autophagy*
527 12(2), 297-311.

528 de Brito KC, de Lemos CT, Rocha JA, Mielli AC, Matzenbacher C, Vargas VM. (2013)
529 Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM_{2.5}) using Salmonella, plants and
530 mammalian cells. *Ecotoxicol Environ Saf.* 94, 14-20.

531 Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Arhami M, Polidori A, Gillen DL, Kleinman MT, Schauer JJ,
532 Sioutas C. (2010) Association of biomarkers of systemic inflammation with organic
533 components and source tracers in quasi-ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 118 (6),
534 756-762.

535 Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, Chen D, Ding W. (2013) PM_{2.5}-induced
536 oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro.* 27(6),
537 1762-1770.

538 Deng X, Zhang F, Wang L, Rui W, Long F, Zhao Y, Chen D, Ding W. (2014). Airborne fine
539 particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells.
540 Apoptosis. 19(7), 1099-1112.

541 Deng X, Feng N, Zheng M, Ye X, Lin H, Yu X, Gan Z, Fang Z, Zhang H, Gao M, Zheng ZJ, Yu
542 H, Ding W, Qian B. (2017) PM_{2.5} exposure-induced autophagy is mediated by lncRNA
543 loc146880 which also promotes the migration and invasion of lung cancer cells. Biochim
544 Biophys Acta Gen Subj. 1861(2), 112-125.

545 Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, Shirali P, Garçon G (2012)
546 Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{0,3-2,5}) produced
547 in rural- urban- or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B).
548 Chem Res Toxicol 25:904-919

549 Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, Shirali P, Garçon G (2015)
550 Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution particulate
551 matter (PM_{0,3-2,5}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells BEAS-2B. Env
552 Res 137:256-267

553 Doiron D, de Hoogh K, Probst-Hensch N, Fortier I, Cai Y, De Matteis S, Hansell AL. (2019) Air
554 pollution, lung function and COPD: results from the population-based UK Biobank study. Eur
555 Respir J. 54(1).

556 Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E, Shirali P (2006)
557 Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and
558 inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. Toxicol in vitro 20: 519-528

559 Ghio AJ, Dailey LA, Soukup JM, Stonehuerner J, Richards JH, Devlin RB (2013) Growth of
560 human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle
561 exposure. *Part Fibre Toxicol* 10:25

562 Gualtieri M, Øvrevik J, Holme JA, Perrone MG, Bolzacchini E, Schwarze PE, Camatini M (2010)
563 Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in
564 human epithelial lung cells, *Toxicol InVitro* 24:29-39

565 Gualtieri M, Ovrevik J, Mollerup S, Asare N, Longhin E, Dahlman HJ, Camatini M, Holme JA
566 (2011) Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2,5}) cause mitotic arrest and cell death:
567 Effects on DNA mitochondria AhR binding and spindle organization. *Mutat Res* 713:18-31

568 Hamra GB, Guha N, Cohen A, Laden F, Raaschou-Nielsen O, Samet JM, Vineis P, Forastiere F,
569 Saldiva P, Yorifuji T, Loomis D (2014) Outdoor particulate matter exposure and lung cancer:
570 a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* [122:906-911](#)

571 Jerrett M, Turner MC, Beckerman BS, Pope III CA, van Donkelaar A, Martin RV, Serre M, Crouse
572 D, Gapstur SM, Krewski D, Diver WR, Coogan PF, Thurston GD, Burnett RT (2016)
573 Comparing the health effects of ambient particulate matter estimated using ground-based versus
574 remote sensing exposure estimates. *Environ Health Perspect* 25(4):552-559

575 Leclercq B, Happillon M, Antherieu S, Hardy E,M, Alleman L,Y, Grova N, Perdrix E, Appenzeller
576 B,M, Lo Guidice J-M, Coddeville P, Garçon G (2016) Differential responses of healthy and
577 chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to
578 air pollution-derived PM₄. *Env Poll* 218:1074-1088

579 Leclercq B, Platel A, Antherieu S, Alleman LY, Hardy EM, Perdrix E, Grova N, Riffault V,
580 Appenzeller BM, Happillon M, Nesslany F, Coddeville P, Lo-Guidice JM, Garçon G. (2017)

581 Genetic and epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial
582 epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM_{2.5}. *Environ Pollut.* 230, 163-177.

583 Leclercq B, Alleman L,Y, Perdrix E, Riffault V, Happillon M, Strecker A, Lo Guidice J-M, Garçon
584 G, Coddeville P (2017) Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture
585 media: Toxicological perspectives? *Env Res*, 156:148-157

586 Leclercq B, Kluza J, Antherieu S, Sotty J, Alleman LY, Perdrix E, Loyens A, Coddeville P, Lo
587 Guidice JM, Marchetti P, Garçon G. (2018) Air pollution-derived PM_{2.5} impairs mitochondrial
588 function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial
589 cells. *Environ Pollut.* 243, 1434-1449.

590 Lee K, Lee J, Kwak M, Cho YL, Hwang B, Cho MJ, Lee NG, Park J, Lee SH, Park JG, Kim YG,
591 Kim JS, Han TS, Cho HS, Park YJ, Lee SJ, Lee HG, Kim WK, Jeung IC, Song NW, Bae KH,
592 Min JK. Two distinct cellular pathways leading to endothelial cell cytotoxicity by silica
593 nanoparticle size. *J Nanobiotechnology* 17(1), 24.

594 Lodovici M, Bigagli E. (2011) Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol.* 487074

595 Longhin E, Pezzolato E, Mantecca P, Holme J,A, Franzetti A, Camatini M, Gualtieri M (2013)
596 Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol in vitro*
597 27:551-559

598 Longhin E, Capasso L, Battaglia C, Proverbio M,C, Consentino C, Cifola I, Mangano E, Camatini
599 M, Gualtieri M (2016) Integrative transcriptomic and protein analysis of human bronchial
600 BEAS-2B exposed to seasonal urban particulate matter. *Environ Poll* 209:87-98

601 Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha
602 N, Baan R, Mattock H, Straif K on behalf of the International Agency for Research on Cancer.
603 Monograph Working Group IARC, Lyon, France (2013) *Lancet Oncol* [14](#):1262-1263

604 Loxham M, Morgan-Walsh RJ, Cooper MJ, Blume C, Swindle RJ, Dennison PW, Howarth PH,
605 Cassee FR, Teagle DAH, Palmer MR, Davies DE (2015) The effects on bronchial epithelial
606 mucociliary cultures of coarse fine and ultrafine particulate matter from an underground railway
607 station. *Toxicol, Sci* 145(1):98-107

608 Napoletano F, Baron O, Vandenabeele P, Mollereau B, Fanto M. (2019) Intersections between
609 Regulated Cell Death and Autophagy. *Trends Cell Biol.* 29(4), 323-338.

610 Oh SM, Kim HR, Park YJ, Lee SY, Chung KH. Organic extracts of urban air pollution particulate
611 matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial
612 cells (BEAS-2B cells). *Mutat Res.* 723(2), 142-151.

613 Park M, Joo HS, Lee K, Jang M, Kim SD, Kim I, Borlaza LJS, Lim H, Shin H, Chung KH, Choi
614 YH, Park SG, Bae MS, Lee J, Song H, Park K. (2018) Differential toxicities of fine particulate
615 matters from various sources. *Sci Rep.* 8(1), 17007.

616 Peixoto MS, de Oliveira Galvão MF, Batistuzzo de Medeiros SR. (2017) Cell death pathways of
617 particulate matter toxicity. *Chemosphere.* 188, 32-48.

618 Perrone MG, Gualtieri M, Consonni V, Ferrero L, Sangiorgi G, Longhin E, Ballabio D, Bolzacchini
619 E, Camatini M. Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or
620 remote site origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary
621 cells. *Environ Pollut.* 176, 215-227.

622 Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. 1997. Respiratory effects are associated
623 with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 155(4), 1376-1383.

624 Raaschou-Nielsen O, Beelen R, Wang M et al. (2016) Particulate matter air pollution components
625 and risk for lung cancer. *Environ Int* 87:66-73

626 Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, Cloonan SM. (2018) Autophagy and inflammation in
627 chronic respiratory disease. *Autophagy* 14(2), 221-232.

628 Riese DJ 2nd, Cullum RL. 2014. Epiregulin: roles in normal physiology and cancer. *Semin Cell*
629 *Dev Biol.* 28, 49-56.

630 Roesslein M, Hirsch C, Kaiser JP, Krug HF, Wick P. Comparability of in vitro tests for bioactive
631 nanoparticles: a common assay to detect reactive oxygen species as an example. *Int J Mol Sci.*
632 14(12), 24320-24337.

633 Saint-Georges F, Abbas I, schuliga S, Verdin A, Gosset P, Mulliez P, Shirali P, Garçon G (2008)
634 Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic
635 hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to
636 airborne particulate matter PM_{2,5}. *Toxicology* 244:220-230.

637 Saint-Georges F, Garçon G, Escande F, Abbas I, Verdin A, Gosset P, Mulliez P, Shirali P (2009)
638 Role of air pollution particulate matter (PM_{2,5}) in the occurrence of loss of heterozygosity in
639 multiple critical regions of 3p chromosome in human epithelial lung cells L132. *Toxicol Lett*
640 187:172-179.

641 Sotty J, Garçon G, Denayer FO, Alleman LY, Saleh Y, Perdrix E, Riffault V, Dubot P, Lo-Guidice
642 JM, Canivet L. Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles
643 in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environ Res.* 176,
644 108538.

645 Schuliga M (2015) NF-kappa B signaling in chronic inflammatory airway disease, *Biomolecules*
646 5:1266-1283

647 Suzuki M, Otsuki A, Keleku-Lukwete N, Yamamoto M (2016) Overview of redox regulation by
648 Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr Opinion Toxicol* 1:29-36

649 Wang T, Garcia JGN, Zhang W. 2012. Epigenetic regulation in particulate matter-mediated
650 cardiopulmonary toxicities: a systems biology perspective. *Curr Pharmacogenomics Person*
651 *Med.* 10(4), 314-321.

652 Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM (2015) Dissecting molecular cross-talk between Nrf2
653 and NF- κ B response pathways. *Biochem, Soc, Trans* 43:621-626.

654 Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. (2014) Methods to
655 monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.* 542,
656 243-262.

657 Xu XC, Wu YF, Zhou JS, Chen HP, Wang Y, Li ZY, Zhao Y, Shen HH, Chen ZH. (2017)
658 Autophagy inhibitors suppress environmental particulate matter-induced airway inflammation.
659 *Toxicol Lett.* 280, 206-212.

660 Zhou W, Tian D, He J, Wang Y, Zhang L, Cui L, Jia L, Li L, Shu Y, Yu S (2016) Repeated PM_{2,5}
661 exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-
662 mediated promoter hypermethylation, *Oncotarget* 7:20691-20703.

663 Zhou W, Tian D, He J, Zhang L, Tang X, Zhang L, Wang Y, Li L, Zhao J, Yuan X, Peng S (2017)
664 Exposure scenario: Another important factor determining the toxic effects of PM_{2,5} and possible
665 mechanisms involved. *Env Poll.* 226:412-425
666

667 **FUNDING SOURCES**

668

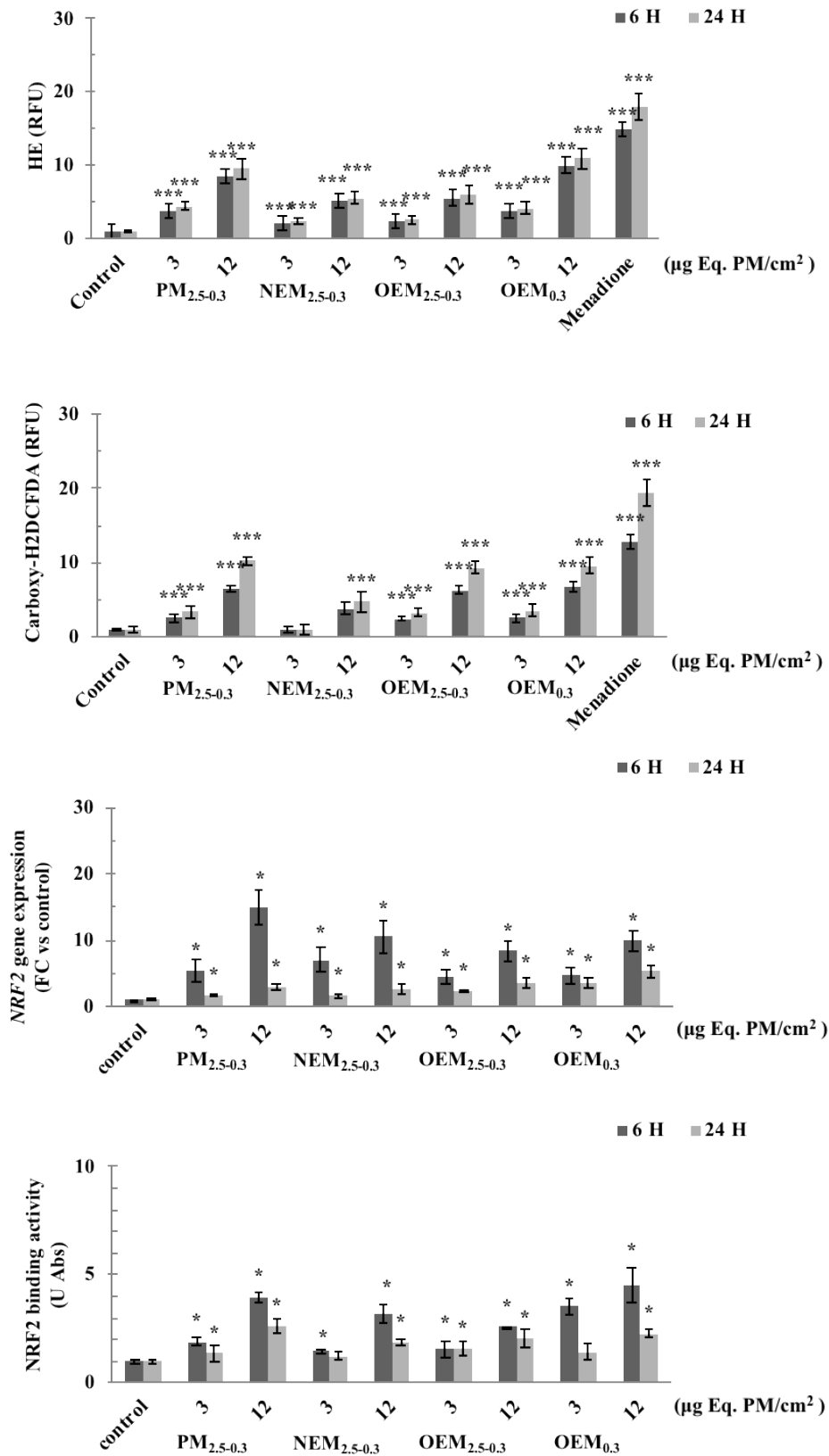
669 The research described in this article benefited from grants from the National Council for
670 Scientific Research of Lebanon (Grant Research Program, Ref: 04-06-2014). The “Unité de
671 Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant” (UCEIV-EA4492) and the “IMPacts de
672 l’Environnement Chimique sur la Santé” (IMPECS- EA4483) both participate in the CLIMIBIO
673 project, which is financially supported by the Hauts-de-France Region Council, the French
674 Ministry of Higher Education and Research, and the European Regional Development Funds.”

675

676 **FIGURES**

677

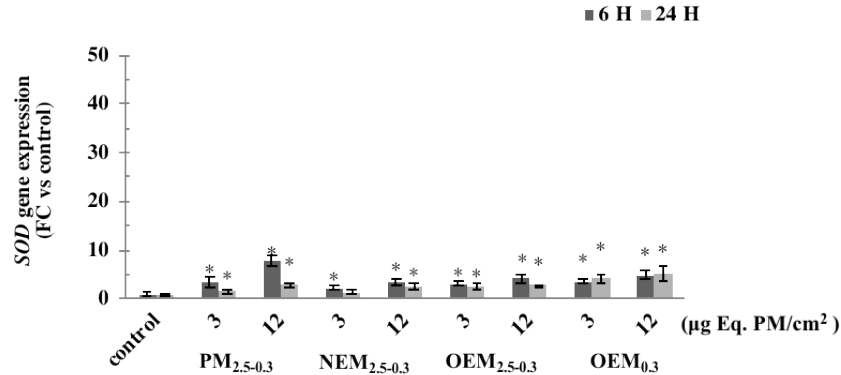
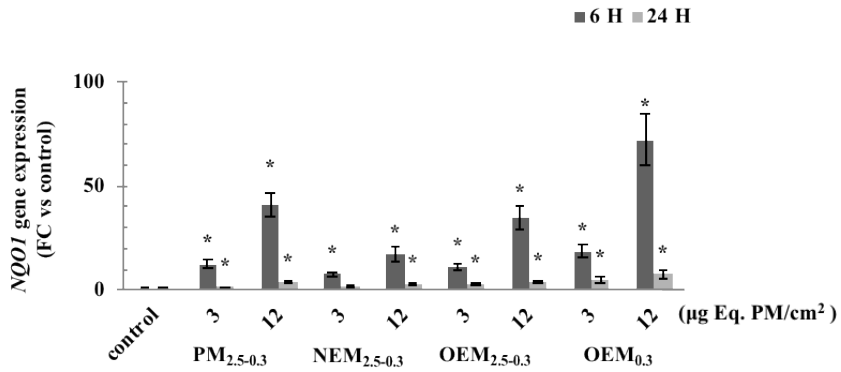
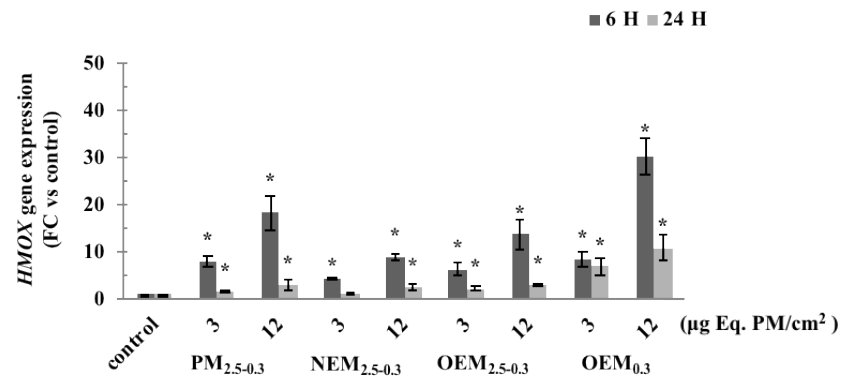
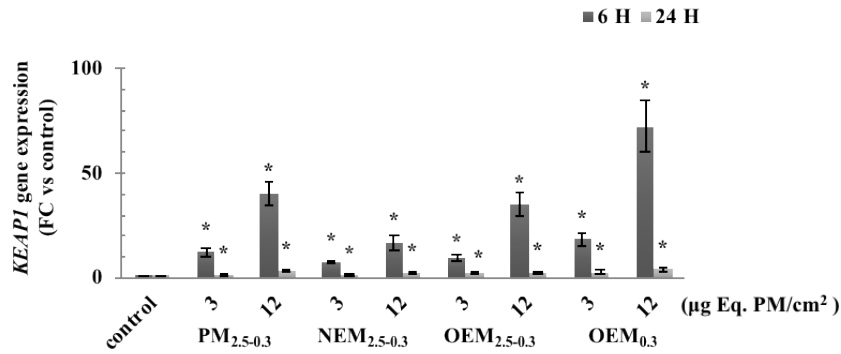
678 **Figure 1**



679

680 Figure 1: Fluorescence intensity of dihydroethidium (HE) and 6-carboxy-2',7'-
681 dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), and gene expression and/or protein
682 binding activity of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2) in BEAS-2B cells, 6 and 24
683 h after their exposure to the fine particles and their extractable and non-extractable fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$, respectively) and to the extractable fraction ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine
684 particles ($PM_{0.3}$). Menadione (100 μ M, 4 h) has been used as positive control for ROS generation.
685 Results, normalized to control, are described by their means and their standard deviations (3
686 replicates for controls, and 3 replicates for exposed cells; Mann-Whitney U-test; vs. controls; * =
687 $p < 0.05$, and *** = $p < 0.001$).
688
689

690 **Figure 2**

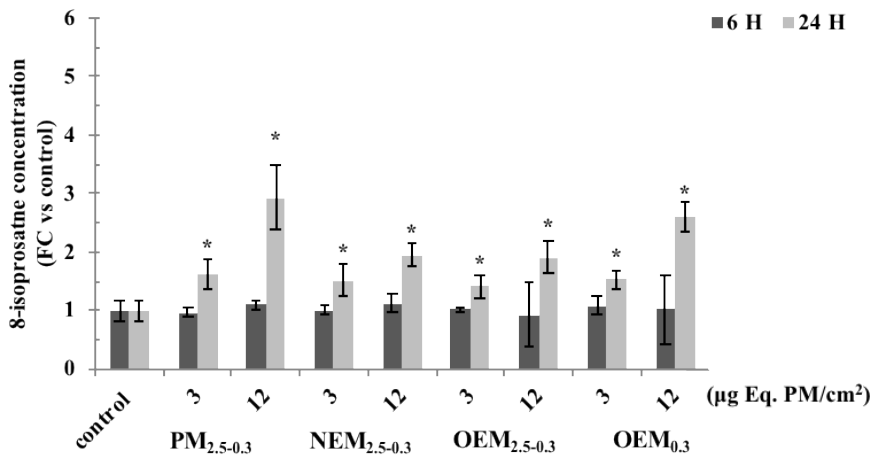
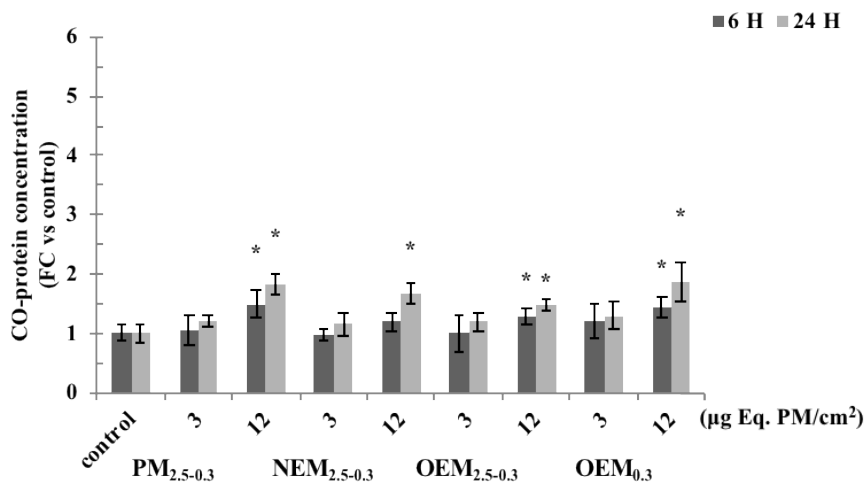
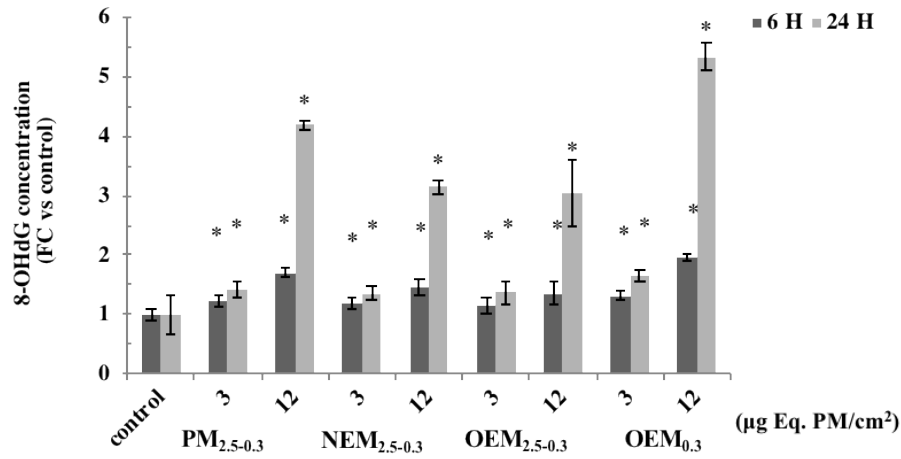


691

692 Figure 2: Gene expression of Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP-1), heme oxygenase 1
693 (HMOX), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), and superoxide dismutase (SOD) in
694 BEAS-2B cells, 6 and 24 h after their exposure to the fine particles and their extractable and non-
695 extractable fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$, respectively) and to the extractable
696 fraction ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine particles ($PM_{0.3}$). Results, normalized to control, are described
697 by their means and their standard deviations (3 replicates for controls, and 3 replicates for exposed
698 cells; Mann-Whitney U-test; vs. controls; * = $p < 0.05$).

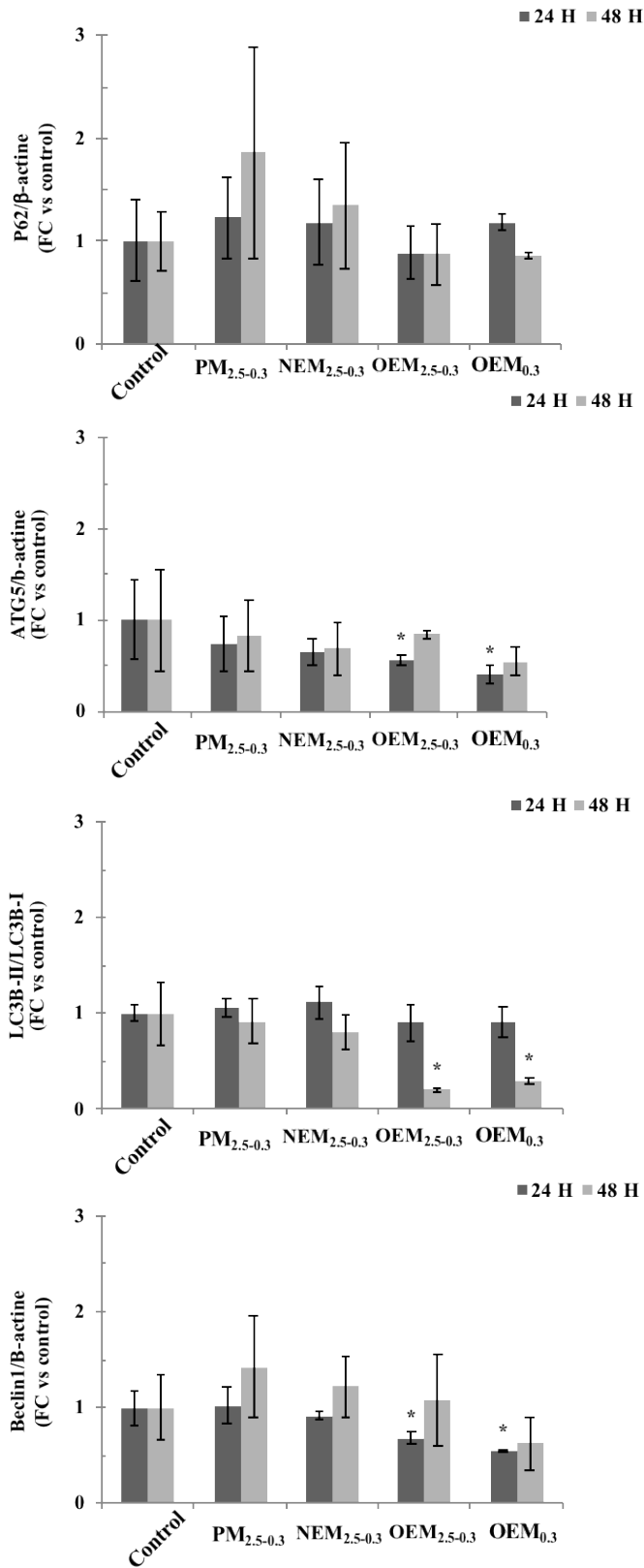
699

700 **Figure 3**



701

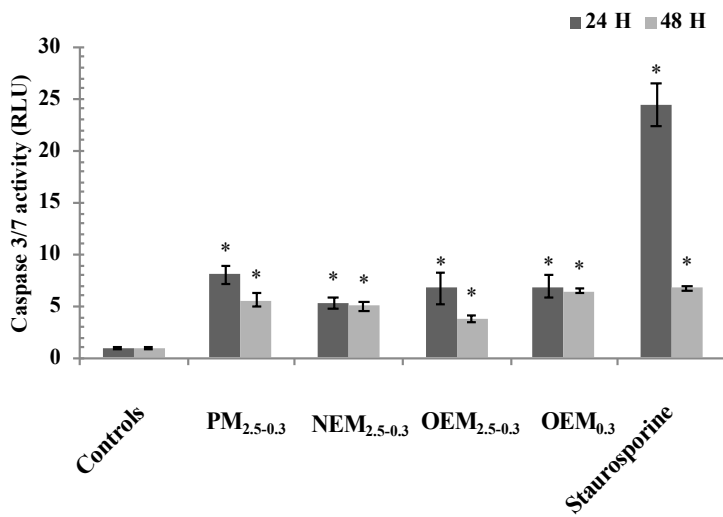
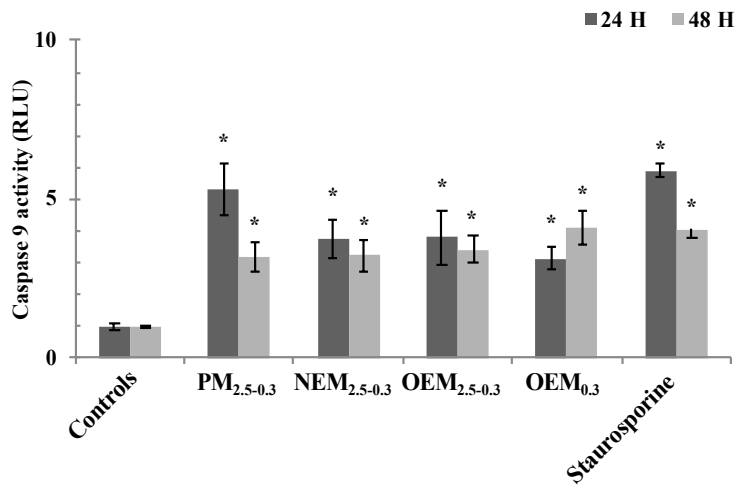
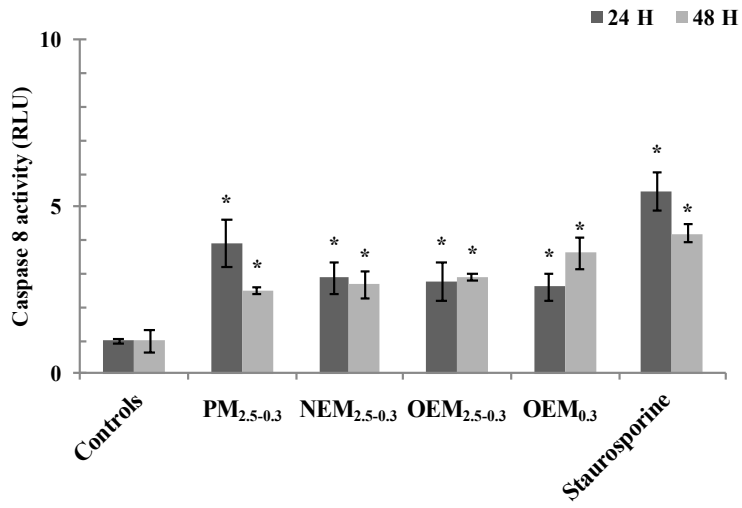
702 Figure 3: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), carbonylated protein (CO-protein), and 8-
703 isoprostane (8-Isop) in BEAS-2B cells, 6 and 24 h after their exposure to the fine particles and
704 their extractable and non-extractable fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$, respectively)
705 and to the extractable fraction ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine particles ($PM_{0.3}$). Results, normalized to
706 control, are described by their means and their standard deviations (3 replicates for controls, and
707 3 replicates for exposed cells; Mann-Whitney U-test; vs. controls; * = $p < 0.05$).
708



711 Figure 4: Protein expression of autophagy-related 5, BECN1/Beclin 1, SQSTM1/p62 protein, and
712 microtubule-associated protein 1 light chain 3 b (MAP1LC3B/LC3B) in BEAS-2B cells 24 and
713 48 h after their exposure to the fine particles and their extractable and non-extractable fractions
714 ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$, respectively) and to the extractable fraction ($OEM_{0.3}$) of the
715 ultrafine particles ($PM_{0.3}$) at $12 \mu\text{g Eq. PM}/\text{cm}^2$. Results, normalized to control, are described by
716 their means and their standard deviations (3 replicates for controls, and 3 replicates for exposed
717 cells; Mann-Whitney U-test; vs. controls; * = $p < 0.05$).

718

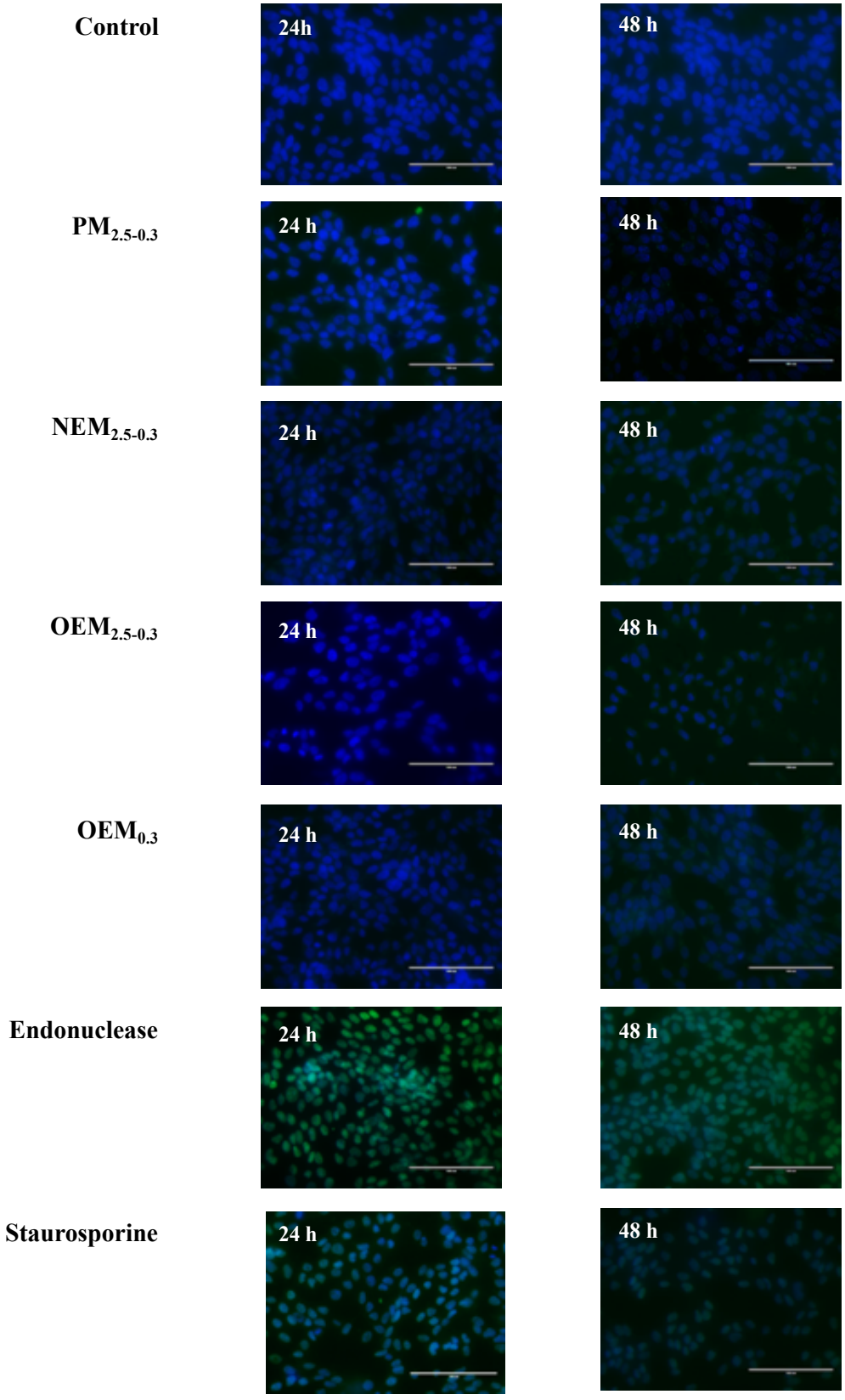
719 **Figure 5**



720

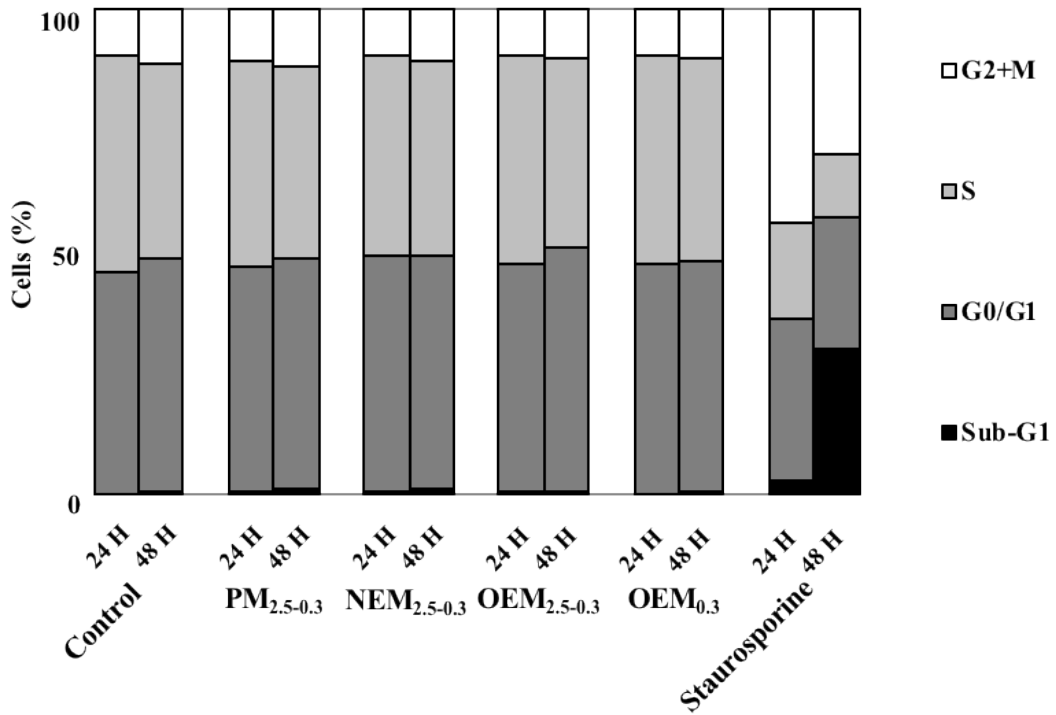
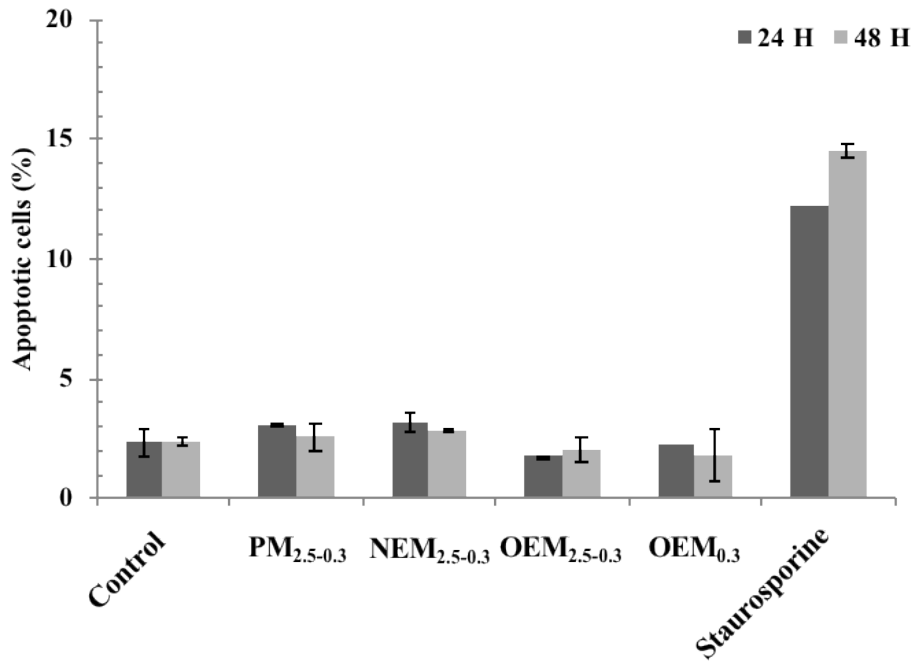
721 Figure 5: Activities of caspases 3/7, 8, and 9 in BEAS-2B cells 24 and 48 h after their exposure to
722 the fine particles and their extractable and non-extractable fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and
723 $OEM_{2.5-0.3}$, respectively) and to the extractable fraction ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine particles ($PM_{0.3}$)
724 at $12 \mu\text{g Eq. PM}/\text{cm}^2$. Staurosporine ($2.5 \mu\text{M}$, 24 or 48h) has been used as positive control for
725 apoptosis. Results, normalized to control, are described by their means and their standard
726 deviations (3 replicates for controls, and 3 replicates for exposed cells; Mann-Whitney U-test; vs.
727 controls; * = $p < 0.05$).

728



731 Figure 6: Immunofluorescence labelling of apoptotic cells using the TdT-mediated dUTP Nick-
732 End Labeling (TUNEL) method in BEAS-2B cells 24 and 48 h after their exposure to the fine
733 particles and their extractable and non-extractable fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$,
734 respectively) and to the extractable fraction ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine particles ($PM_{0.3}$) at $12 \mu\text{g Eq.}$
735 PM/cm^2 . Endonuclease and staurosporine ($2.5 \mu\text{M}$) served as positive controls.
736

737 **Figure 7**



738

739 Figure 7: Detection of apoptotic cells using the Single-Channel Dead Cell Apoptosis Kit with
740 Annexin V Alexa Fluor™ 488 and SYTOX™ Green Dyes (ThermoFisher scientific) and cell cycle
741 analysis using Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 647 Flow Cytometry Assay Kit of BEAS-2B
742 cells 24 and 48 h after their exposure to the fine particles and their extractable and non-extractable
743 fractions ($PM_{2.5-0.3}$, $NEM_{2.5-0.3}$, and $OEM_{2.5-0.3}$, respectively) and to the extractable fraction
744 ($OEM_{0.3}$) of the ultrafine particles ($PM_{0.3}$) at $12 \mu\text{g Eq. PM}/\text{cm}^2$. Results are described by their
745 means and/or their standard deviations (3 replicates for controls, and 3 replicates for exposed cells;
746 Mann-Whitney U-test; vs. controls; * = $p < 0.05$). Staurosporine ($2.5 \mu\text{M}$) served as positive
747 controls
748

Chapitre 4 : Discussion générale

Chapitre IV : Discussion générale

Durant la dernière décennie, de nombreuses études se sont intéressées à la pollution atmosphérique et surtout à la fraction particulaire. L'exposition à long terme aux particules atmosphériques est désormais clairement associée à l'apparition de diverses maladies respiratoires, telles que l'asthme, la BPCO, ou le développement de maladies cardiovasculaires, et peut aboutir au développement du cancer (Ghorani-Azam et al., 2016; Loomis et al., 2013).

La composition, mais aussi la granulométrie de ces particules conditionnent leurs effets toxiques. Les PM_{10} sont retenues dans la partie supérieure du système respiratoire, alors que les $PM_{2,5}$ peuvent atteindre les voies aériennes inférieures. Au sein des $PM_{2,5}$, la fraction la plus fine (particules ultrafines, $PM_{0,1}$) peut même traverser la barrière alvéolo-sanguine pour atteindre la circulation systémique et toucher l'ensemble des organes. Du point de vue composition, les $PM_{2,5}$ représentent un mélange hétérogène de composés inorganiques tels que les sels et les métaux, de composés organiques tels que les HAP, COVs, dioxines, PCB..., mais contiennent aussi une fraction biologique (pollens, endotoxines bactériennes et/ou fongiques).

La toxicité des PM a été étudiée dans de nombreuses études que ce soit à l'aide de modèles *in vitro* ou *in vivo*, mais jusqu'à présent, très peu de travaux se sont intéressés à ce qui rend une particule atmosphérique toxique, ou en d'autres termes, à identifier la fraction au sein des particules qui est la plus impliquée dans l'apparition des effets toxiques observés. De même, peu d'études ont abordé l'effet des différentes fractions granulométriques de $PM_{2,5}$, et notamment celui de la fraction ultrafine et de ses composés associés dont la nocivité a récemment été soulignée par l'ANSES (ANSES, 2019).

Les objectifs de ce travail de thèse étaient, d'une part, d'évaluer et de comparer la toxicité des $PM_{2,5-0,3}$ dans leur entièreté avec celle des fractions organique extractible ($EOM_{2,5-0,3}$) et non extractible ($NEM_{2,5-0,3}$), et d'autre part, d'évaluer la différence entre les fractions fines ($PM_{2,5-0,3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0,3}$) constitutives des $PM_{2,5}$ en termes de composition chimique et de toxicité. A cette fin, un extrait organique de particules quasi-ultrafines ($EOM_{0,3}$) a été considéré.

Durant la période d'échantillonnage réalisé entre janvier et mars 2017, la concentration atmosphérique moyenne de $PM_{2.5}$ était de $54 \mu\text{g}/\text{m}^3$, dépassant largement la valeur journalière recommandée par l'OMS ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$). L'analyse de la fraction organique a montré que la fraction quasi-ultrafine ($PM_{0.3}$) renfermait la majorité des HAPs et leurs dérivés en comparaison aux $PM_{2.5-0.3}$ avec un rapport de concentration de 47, 17 et 4 respectivement pour les HAP, O-HAP et N-HAP. Ceci peut être mis en relation avec la forte influence des sources de combustion (fortement génératrices de composés organiques) sur cette gamme granulométrique (Minutolo et al., 2010). L'analyse de la fraction inorganique a montré la présence des éléments majeurs Al, Ca, Mg, Fe liés à la resuspension des poussières de sol, et les éléments traces Ba, Ni et Zn liés aux émissions véhiculaires. De plus, les ions hydrosolubles majoritairement détectés étaient le NO_3^- et le SO_4^{2-} résultant principalement de la conversion des composés gazeux NO_x et SO_2 .

Nous avons évalué l'effet des différentes fractions de PM sur l'induction de différents mécanismes de toxicité tels que l'activation métabolique, le stress oxydant, l'inflammation, les dommages à l'ADN, l'autophagie et l'apoptose, sur des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B. Ces dernières ont été exposées à deux concentrations de particules (3 et $12 \mu\text{g PM-eq}/\text{cm}^2$), pendant des temps compris entre 6 et 72 heures selon le mécanisme étudié. L'ensemble des mécanismes étudiés et le lien étroit existant entre eux est présenté sur la **Figure 44**.

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité des cellules à internaliser les différentes fractions des PM au travers de l'activation métabolique des composés organiques via la voie de l'Ahr et la voie des CYP. L'induction de ces deux voies a été observée avec des intensités et des cinétiques différentes, pour l'ensemble des échantillons hormis les $NEM_{2.5-0.3}$ pour lesquels la fraction organique a été extraite. En particulier, l'induction de ces deux voies a été observée pour les $PM_{2.5-0.3}$ aux deux temps 6 et 24 h et aux deux doses étudiées alors que celles-ci n'ont été observée que pour la dose la plus élevée et uniquement à 6 h pour l' $EOM_{2.5-0.3}$, représentant la fraction organique extractible des $PM_{2.5-0.3}$ (**Tableau 8**). La nature et la concentration des composés organiques peuvent être considérées comme identiques au sein des $PM_{2.5-0.3}$ et l' $EOM_{2.5-0.3}$, cependant le degré d'interaction de ces composés avec la matrice particulaire, qui conditionne également leur accessibilité (biodisponibilité), diffère grandement. Ainsi, une première hypothèse peut être émise pour justifier cette observation : les composés présents dans l' $EOM_{2.5-0.3}$ seraient plus accessibles à

la cellule, permettant une métabolisation rapide, dans un temps inférieur à 6h pour les faibles concentrations, et inférieur à 24 heures pour les plus fortes.

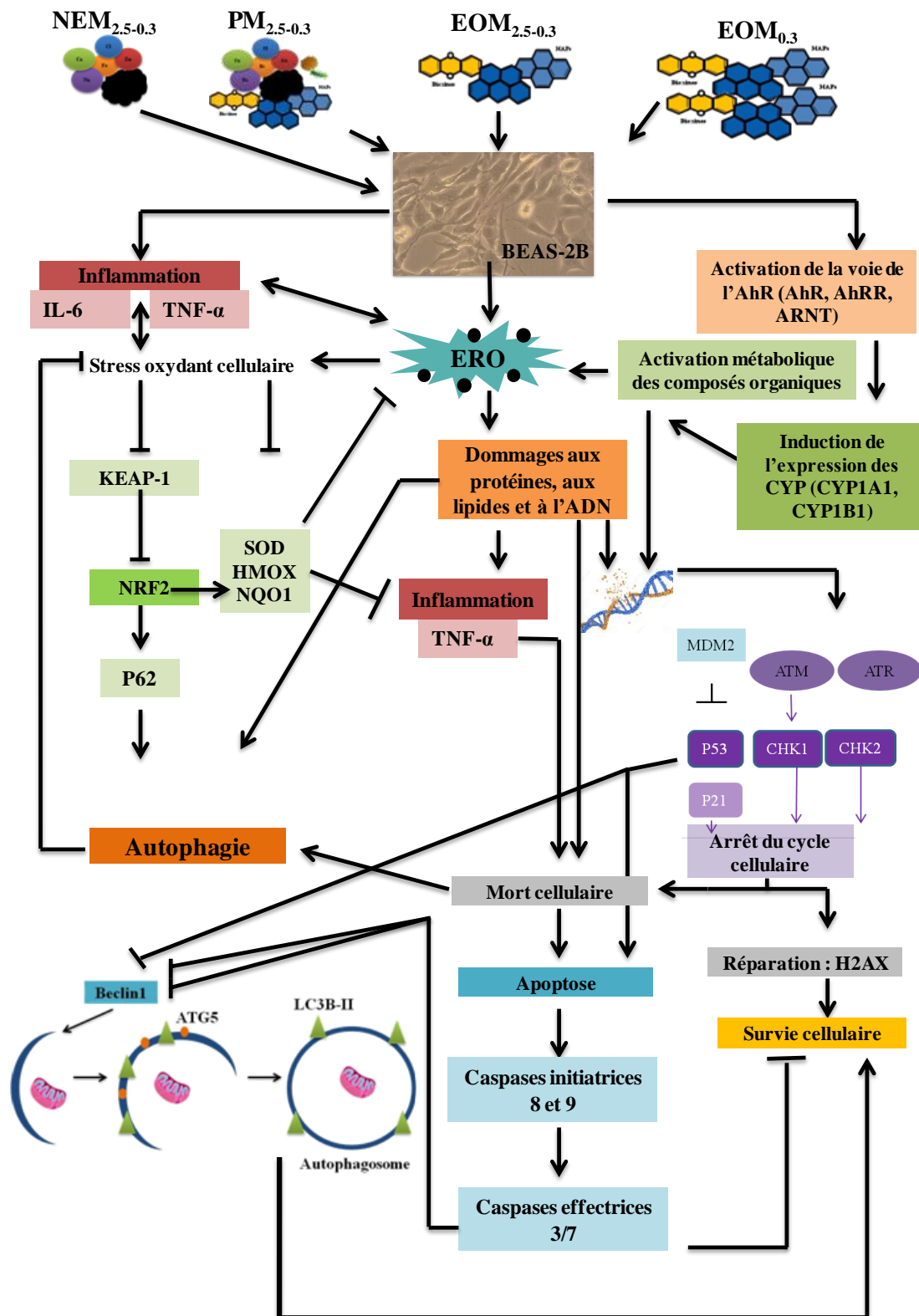


Figure 44 : Schéma de synthèse illustrant les mécanismes potentiellement induits par une exposition aux particules atmosphériques et à leurs constituants, et étudiés lors de ce travail de thèse.

Au sein des $PM_{2.5-0.3}$, cette activation métabolique serait plus prolongée dans le temps, les composants étant plus en interaction avec la matrice particulaire et de ce fait moins biodisponibles que dans l'extrait organique. Selon leur degré d'interaction avec les particules, la cinétique d'action des HAP dans la cellule est modifiée, provoquant ainsi des mécanismes de toxicité plus ou moins retardés. Des travaux menés au laboratoire avaient déjà montré la forte stabilité de certains composés organiques à l'état particulaire (Billet et al., 2007). L'hypothèse de la persistance de composés organiques fortement liés à la matrice particulaire, et non extraits peut être écartée puisque la fraction $NEM_{2.5-0.3}$, n'a pas induit les marqueurs des voies étudiées. D'autre part, Korashy et al. (2005) ont aussi montré la capacité des métaux de transition à induire l'expression du CYP1A1 (Korashy and El-Kadi, 2005), mais dans notre cas, cette hypothèse n'a pas été vérifiée puisqu'aucune induction du CYP1A1 n'a été observée dans le cas des $NEM_{2.5-0.3}$, qui contiennent la fraction inorganique et de nombreux éléments métalliques.

Tableau 8 : Expression des gènes impliqués dans la voie de l'AhR (AhR, AhRR, ARNT) et la voie de métabolisation des composés organiques (CYP1A1, CYP1B1, EPHX-1, GSTA4) suite à l'exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$), pendant 6 et 24 heures (↗: Augmentation significative, = pas de variation).

		$PM_{2.5-0.3}$		$NEM_{2.5-0.3}$		$OEM_{2.5-0.3}$		$OEM_{0.3}$	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
6 h	<i>AHR</i>	↗	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>AhRR</i>	↗	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>ARNT</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>CYP1A1</i>	↗	↗	=	=	=	↗	↗	=
	<i>CYP1B1</i>	↗	↗	=	=	=	↗	↗	↗
	<i>EPHX-1</i>	=	=	=	=	=	=		=
	<i>GSTA-4</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
24 h	<i>AhR</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>AhRR</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>ARNT</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>CYP1A1</i>	↗	↗	=	=	=	=	↗	↗
	<i>CYP1B1</i>	↗	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>EPHX-1</i>	=	↗	=	=	=	=	=	↗
	<i>GSTA-4</i>	=	=	=	=	=	=	=	↗

De plus, en comparant les deux extraits organiques, l'EOM_{0.3} a été capable d'induire davantage ces mécanismes que l'EOM_{2.5-0.3}. Ceci peut être relié à la concentration en composés organiques plus importante dans l'EOM_{0.3}

L'activation métabolique des composés organiques, conjuguée à la présence de certains éléments métalliques est connue pour déclencher la production d'ERO toxiques pour la cellule, parmi lesquels H₂O₂ et O₂⁻. Nous avons ainsi mesuré la production de ces deux espèces et avons mis en évidence une concentration plus importante après 24 heures d'exposition à la concentration la plus élevée (12 µg/cm²), avec cependant des différences selon les fractions de PM_{2.5} considérées. Ainsi, l'échantillon de PM_{2.5-0.3} engendre une production d'ERO plus importante que les NEM_{2.5-0.3} et l'EOM_{2.5-0.3}. D'autre part, nous avons également observé une production d'ERO plus importante lorsque les cellules étaient exposées à la fraction organique de particules quasi-ultrafines (EOM_{0.3}) en comparaison à l'extrait organique des PM_{2.5-0.3} (EOM_{2.5-0.3}) (Tableau 9).

Tableau 9 : Induction des espèces réactives de l'oxygène H₂O₂ et O₂⁻ et des lésions à l'ADN (8-OHdG), aux protéines (protéines carbonylées) et aux lipides (8-IsoP) suite à l'exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm²), pendant 6 et 24 heures (↗: Augmentation significative (↗↗↗ > ↗↗ > ↗), = pas de variation).

		PM _{2.5-0.3}		NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
O ₂ ⁻	6 h	↗	↗↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	24 h	↗	↗↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗↗
H ₂ O ₂	6 h	↗	↗↗	=	=	↗	↗↗	↗	↗↗
	24 h	↗	↗↗	=	↗	↗	↗↗	↗	↗↗
8-OHdG	6 h	↗	↗	=	↗	=	↗	=	↗
	24 h	↗	↗↗↗	↗	↗↗	↗	↗↗	↗	↗↗↗
8-IsoP	6 h	=	↗	=	=	=	↗	=	↗
	24 h	↗	↗↗↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗↗↗
Protéines carbonylées	6 h	=	↗	=	=	=	↗	=	↗↗↗
	24 h	=	↗↗	=	↗↗	=	↗	=	↗↗↗

Ceci montre que chaque fraction des PM peut induire la génération d'ERO, que ce soit la fraction organique ou inorganique, mais avec un potentiel différent : l'échantillon de PM_{2.5-0.3} semble induire davantage le mécanisme de formation des ERO que les différentes fractions

séparées (doses équivalent PM considérées). Ceci peut être relié à la présence de différents constituants capables de contribuer simultanément à la production d'ERO au sein des PM_{2.5-0.3} (métaux, HAP...) et nous montrons un effet cumulatif de ces fractions et de leurs constituants sur la production des ERO.

Les ERO sont, en conditions physiologiques normales, continuellement produites à un niveau basal par les cellules. Cependant, une agression extérieure, biotique ou abiotique, telle que l'exposition aux PM, va occasionner une surproduction d'ERO, causant ainsi un déséquilibre entre la génération d'espèces pro-oxydantes et le système antioxydant de détoxification, pouvant aboutir à un état de stress oxydant. Cette situation peut entraîner des atteintes à diverses macromolécules biologiques cellulaires (dommages aux protéines et aux lipides cellulaires), déclencher un processus inflammatoire, et des mécanismes de génotoxicité suite à l'oxydation de l'ADN. Dans notre travail, nous avons montré que l'ensemble des fractions des PM_{2.5-0.3} et EOM_{0.3} étaient capables de générer des ERO (H₂O₂ et O₂⁻), mais aussi de produire des dommages à la membrane plasmique, aux protéines cellulaires ou à l'ADN (**Tableau 9**). La majorité des fractions étudiées et/ou les composés qu'elles contiennent sont donc capables d'induire un stress oxydant au niveau de la cellule, dès la plus faible dose d'exposition et le temps le plus court. Nos résultats sont en accord avec d'autres études ayant mis en évidence la capacité des métaux à induire la production d'ERO et de lésions oxydatives ([Chen and Lippmann, 2009](#); [de Kok et al., 2006](#); [Shahid et al., 2014](#); [Xu et al., 2017](#)), mais aussi celle des composés organiques, et surtout des HAP via leur activation métabolique, à induire ces mêmes mécanismes ([Michael et al., 2013](#)).

En réponse au stress oxydant, la cellule peut activer une voie de défense telle que la voie NRF2, permettant l'élimination des ERO. NRF2 agit comme un facteur de transcription de plusieurs enzymes impliquées dans la défense contre ce stress, parmi lesquelles la SOD, acteur majeur du système antioxydant enzymatique, HMOX, qui en plus de sa fonction antioxydante, peut intervenir dans le processus anti-inflammatoire et NQO1, impliquée dans la phase II de la biotransformation des composés organiques. Suite à l'exposition des cellules aux différents échantillons, cette voie de défense semble majoritairement être activée après 6 heures d'exposition et principalement par les PM_{2.5-0.3} par rapport aux NEM_{2.5-0.3} et EOM_{2.5-0.3}. Par ailleurs, l'exposition à l'EOM_{0.3} provoque une activation accrue de cette voie en comparaison à l'EOM_{2.5-0.3} (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans la voie de défense Nrf2, suite à l'exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm²), pendant 6 et 24 heures. (↗: Augmentation significative (↗↗↗ > ↗↗ > ↗), = pas de variation).

		PM _{2.5-0.3}		NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
6 h	<i>NRF2</i>	↗	↗↗↗	↗	↗↗	↗	↗↗	↗	↗↗
	<i>KEAP1</i>	↗↗	↗↗↗	↗	↗↗	↗↗	↗↗↗	↗↗	↗↗↗
	<i>HMOX</i>	↗↗	↗↗↗	↗	↗↗	↗↗	↗↗↗	↗	↗↗↗
	<i>NQO1</i>	↗↗	↗↗↗	↗	↗↗	↗↗	↗↗↗	↗↗	↗↗↗
	<i>SOD</i>	↗↗	↗↗↗	↗	↗	↗	↗↗	↗	↗
24 h	<i>NRF2</i>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	<i>KEAP1</i>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	<i>HMOX</i>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗↗
	<i>NQO1</i>	↗	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗
	<i>SOD</i>	↗	↗	=	↗	↗	↗	↗	↗

De plus, notre étude montre que l'expression de la SOD et donc la défense cellulaire est réduite à 24h et à la plus forte concentration d'exposition. Dans le même temps, nous avons montré que dans ces mêmes conditions, les dommages aux protéines et aux lipides cellulaires étaient les plus importants (Tableau 9), ce qui est parfaitement cohérent. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux publiés (Ndong Ba et al., 2019; Cachon et al., 2014; Dergham et al., 2012).

Il est admis que le stress oxydant, de même que l'accumulation de protéines et de lipides cellulaires endommagés par les ERO, peuvent conduire à l'activation d'un processus inflammatoire via l'activation de facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (NF-KB) (Donaldson et al., 2005; Lawal, 2017) et l'expression génique de médiateurs pro-inflammatoires (Rahman et MacNee, 1998). En outre, des études ont montré un rôle anti-inflammatoire de NRF2 via HMOX, inhibiteur de NF-KB, et donc de la sécrétion des cytokines inflammatoires (Fischer et al., 2015; Ma et al., 2013, Abbas et al., 2019, Ahmed et al., 2017).

L'effet pro-inflammatoire des particules atmosphériques a été largement décrit dans la bibliographie (Boulbil et al. 2013; Ghio et al. 2013; Gualtieri et al. 2010, 2011; Leclercq et al.

2016, 2018; Longhin et al. 2013; Loxham et al. 2015; Sotty et al. 2019). Il a été montré que les HAP et autres composés organiques, sont impliqués dans l'induction du stress oxydant et du processus inflammatoire dans des modèles de cellules épithéliales bronchiques (Boublil et al. 2013; Deng et al. 2017; Dergham et al. 2012, 2015; Gualtieri et al. 2010, 2011; Longhin et al. 2013, 2016; Zhou et al. 2014), de même pour les métaux (Lodivici and Bigagli, 2011). Même si nous montrons une induction accrue de TNF- α et IL-6 dans certaines conditions (**Tableau 11**), il apparait aussi que des échantillons capables de générer un stress oxydant et des dommages cellulaires, n'expriment pas certains des marqueurs d'inflammation étudiés. Ceci pourrait s'expliquer, comme mentionné auparavant, par l'inhibition du processus inflammatoire via la voie NRF2.

Tableau 11 : Evaluation de l'expression protéique de TNF- α et IL-6, suite à l'exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 $\mu\text{g PM-eq/cm}^2$), pendant 6 et 24 heures (↗: Augmentation significative (↗↗↗>↗↗>↗), = pas de variation).

		PM _{2.5-0.3}		NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
6 h	TNF- α	=	↗	↗↗↗	↗↗↗	↗↗↗	↗↗↗	=	↗
	IL-6	=		↗	↗↗	↗↗	↗↗	=	=
24 h	TNF- α	↗	↗↗	=	↗	↗↗↗	=	=	=
	IL-6	↗		↗↗	=	=	=	=	↗

Notre étude a montré des dommages oxydatifs à l'ADN, plus importants après 24 heures d'exposition aux PM_{2.5-0.3} qu'aux NEM_{2.5-0.3} et EOM_{2.5-0.3}, et plus importants aussi pour l'EOM_{0.3} par rapport à l'EOM_{2.5-0.3} (**Tableau 9**). Compte tenu de la complexité des particules atmosphériques, l'identification des composés chimiques responsables de l'effet génotoxique n'est pas toujours claire. Plusieurs études ont suggéré le rôle des HAP, et donc de la fraction organique (Courter et al., 2007; Ramos de Rainho et al., 2013), tandis que d'autres ont suggéré le rôle des métaux solubles dans l'eau (Prahald et al., 2001) et non solubles dans l'eau (Ghio, 1999; Knaapen et al., 2002) dans l'initiation du stress oxydant et des dommages de l'ADN.

En réponse aux dommages oxydatifs à l'ADN causés par les ERO, une cascade de phosphorylation peut avoir lieu aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire (Fragkos et al., 2009) afin de réparer des dommages et recouvrir l'intégrité génomique, avec notamment

l'intervention de P21 et des CheckPoint Kinases 1 et 2. Dans notre étude, une très faible induction de ces protéines a été observée à la suite de l'exposition de cellules BEAS-2B aux différentes fractions de PM_{2.5-0.3}, y compris les NEM_{2.5-0.3} (Tableau 12). Cela indique que la plupart des métabolites biologiquement actifs résultant de l'activation métabolique des particules atmosphériques, de leur extrait organique et de la fraction non extractible sont tous conjugués au cours de la phase II de ce processus et éliminés de la cellule. Cependant, des résultats différents ont été observés avec l'EOM_{0.3}. La plus forte dose d'EOM_{0.3} a pu induire une augmentation significative d'ATR, de CHK1 et de CHK2, de MDM2, de P21 et de P53, après 72 h d'exposition. Sachant que cette fraction granulométrique contient beaucoup plus de composés organiques que les PM_{2.5-0.3}, ceci suggère, en accord avec la littérature, que l'effet génotoxique des particules atmosphériques est plutôt lié à la fraction organique (Jung et al., 2012; Velali et al., 2018).

Tableau 12 : Expression des protéines impliquées dans la voie de génotoxité/ arrêt du cycle cellulaire, suite à l'exposition des BEAS-2B aux deux concentrations (C1= 3 et C2= 12 µg PM-eq/cm²), pendant 24 et 72 heures. (↗: Augmentation significative, ↘: diminution significative, = pas de variation)

		PM _{2.5-0.3}		NEM _{2.5-0.3}		OEM _{2.5-0.3}		OEM _{0.3}	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
24 h	ATR	=	=	=	=	=	=	=	=
	CHK1	=	=	=	=	=	=	=	↗
	CHK2	=	=	=	=	=	=	=	=
	H2AX	=	=	=	=	=	=	=	=
	MDM2	↗	↗	=	↗	=	=	=	↗
	P21	=	=	=	=	=	=	=	↗
	P53	=	=	=	=	=	↗	↗	↗
72 h	ATR	=	=	=	=	=	=	=	↗
	CHK1	=	=	=	=	=	=	↗	↗
	CHK2	=	=	=	=	=	=	↗	↗
	H2AX	=	=	↘	↘	↘	=	↗	↗
	MDM2	=	=	↗	=	=	=	=	↗
	P21	↗	=	=	=	=	=	=	↗
	P53	=	=	↗	=	=	=	↗	↗

En cas d'attaques cellulaires modérées, NRF2 peut induire l'expression de P62, qui à son tour, va se lier au niveau des agrégats des macromolécules endommagées d'une part et aux autophagosomes d'autre part, afin de permettre l'élimination des macromolécules endommagées par autophagie, assurant ainsi une survie cellulaire. Cependant, dans le cas d'attaques cellulaires sévères et d'un échec de la régulation des dommages cellulaires par la voie de l'autophagie et/ou des systèmes de réparation, l'apoptose prend place via l'induction des caspases et inhibe l'autophagie, aboutissant à la mort cellulaire (Cooper, 2018). Il a été démontré dans une étude précédente, que suite à l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine, l'apoptose prend place dans les cellules BEAS-2B, ce qui confère à l'autophagie un rôle dans le maintien de l'homéostasie et de la fonctionnalité cellulaire (Liu et al., 2015).

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'induction de ces deux mécanismes, en évaluant l'expression des protéines ATG5, LC3B-II et P62 impliquées dans l'autophagie, et les caspases 8 et 9, et 3/7 impliquées dans l'apoptose cellulaire.

Il apparaît que la production excessive d'ERO et l'installation d'un stress oxydant sévère a induit des dommages cellulaires au point d'aboutir à l'induction de l'apoptose (induction significatives de P53 et des caspases initiatrices 8 et 9 et effectrices 3/7) par tous les échantillons (Tableau 13).

Tableau 13 : Evaluation de l'expression protéique des caspases 3/7, caspase 8 et 9 suite à l'exposition des BEAS-2B à 12 µg PM-eq/cm², pendant 24 et 48 heures (↗ Augmentation significative (↗↗>↗), = pas de variation).

		PM _{2.5-0.3}	NEM _{2.5-0.3}	OEM _{2.5-0.3}	OEM _{0.3}
		C2	C2	C2	C2
24 h	Caspase 3/7	↗↗	↗	↗	↗
	Caspase 8	↗↗	↗	↗	↗
	Caspase 9	↗↗	↗	↗	↗
48 h	Caspase 3/7	↗	↗	↗	↗
	Caspase 8	↗	↗	↗↗	↗↗
	Caspase 9	↗	↗	↗↗	↗↗

Concernant l'induction de l'autophagie, aucune augmentation significative n'a été observée pour ATG5 et Beclin suite à l'exposition des cellules aux PM_{2.5-0.3} et aux NEM_{2.5-0.3}.

Au contraire, des diminutions significatives de taux d'ATG5 et Beclin1 d'une part, et de LC3b-II/LC3B-I d'autre part, ont été observées après 24 et 48 heures d'exposition à l'EOM_{2.5-0.3} et à l'EOM_{0.3} (**Tableau 14**) suggérant donc, dans nos conditions d'exposition et pour les deux extraits organiques, contrairement aux échantillons particulaires, une inhibition de l'autophagie qui favoriserait l'entrée des cellules en apoptose.

Tableau 14 : Evaluation de l'expression protéique des marqueurs de l'autophagie (ATG5, Beclin1, P62 et LC3B-II) suite à l'exposition des BEAS-2B à 12 µg PM-eq/cm², pendant 24 et 48 heures (⬇ : diminution significative, = pas de variation)

		PM _{2.5-0.3}	NEM _{2.5-0.3}	OEM _{2.5-0.3}	OEM _{0.3}
		C2	C2	C2	C2
24 h	ATG5	=	=	⬇	⬇
	Beclin 1	=	=	⬇	⬇
	LCB-II	=	=	=	=
	P62	=	=	=	=
48 h	ATG5	=	=	=	=
	Beclin 1	=	=	=	=
	LCB-II	=	=	⬇	⬇
	P62	=	=	=	=

Conclusions et Perspectives

Conclusion et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'accroître les connaissances des mécanismes de toxicité des $PM_{2.5}$ et en particulier de s'intéresser à la différence en termes de composition et de toxicité entre la fraction fine ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafine ($PM_{0.3}$) des PM, et de discriminer les effets des fractions organique extractible (EOM) et non-extractible (NEM). Ce travail se proposait donc d'apporter des résultats novateurs et des éléments de discussion afin de déterminer quelle fraction des $PM_{2.5}$ est la plus impliquée dans la réponse toxique observée.

Dans ce cadre, nous avons échantillonné des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) à Beyrouth, Liban, sur un site fortement influencé par le trafic routier. Après échantillonnage et caractérisation physico-chimique des particules, nous avons préparé différents échantillons destinés à l'exposition cellulaire, afin d'évaluer et de comparer les effets des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) en comparaison avec la fraction organique extractible ($EOM_{2.5-0.3}$), la fraction non-extraite par le dichlorométhane ($NEM_{2.5-0.3}$) et un extrait organique de la fraction quasi-ultrafine ($EOM_{0.3}$).

La concentration moyenne des $PM_{2.5}$ durant la période de l'échantillonnage conduite entre janvier et mars 2017 était de $54 \mu\text{g}/\text{m}^3$, concentration alarmante car dépassant largement la valeur journalière recommandée par l'organisation mondiale de la santé ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$). L'analyse de la fraction organique a montré que la fraction quasi-ultrafine ($EOM_{0.3}$) renfermait la majorité des HAPs et dérivés en comparaison aux particules fines ($PM_{2.5-0.3}$). L'analyse de la fraction inorganique a montré la présence des éléments majeurs Al, Ca, Mg, Fe liés à la resuspension de la poussière du sol, et les éléments traces Ba, Ni et Zn liés aux émissions véhiculaires. De plus, les ions hydrosolubles majoritairement détectés étaient le NO_3^- et le SO_4^{2-} résultant principalement de la conversion des composés gazeux NO_x et SO_2 .

L'évaluation des effets toxiques des particules atmosphériques et de leurs différentes fractions suggère que l'activation métabolique des HAP, lorsqu'ils sont associés aux PM, est retardée et prolongée dans le temps par rapport aux HAP contenus dans l'extrait organique. La fraction non extractible au DCM des particules, $NEM_{2.5-0.3}$, n'a pas conduit à une induction de ce mécanisme puisque dépourvue de composés organiques.

L'évaluation du stress oxydant a montré que toutes les fractions testées induisaient cette voie, avec cependant des intensités différentes. Les particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) sont capables de produire plus d'espèces réactives de l'oxygène, de causer davantage de lésions au niveau des macromolécules biologiques et d'activer plus intensément les mécanismes de défense cellulaire, en comparaison à l' $EOM_{2.5-0.3}$ et aux $NEM_{2.5-0.3}$. Il est aussi apparu que le stress oxydant et ses conséquences étaient plus marqués après exposition des cellules à l' $EOM_{0.3}$ que dans l' $EOM_{2.5-0.3}$.

Enfin, et dans nos conditions d'étude, l'exposition des cellules BEAS-2B pendant 48 heures aux extraits organiques des fractions fines et quasi-ultrafines présente plutôt une tendance à inhiber l'autophagie cellulaire. Par ailleurs, ces deux extraits ont en parallèle montré une capacité importante à induire la voie apoptotique. Ces résultats sont probablement à mettre en lien avec une biodisponibilité accrue des composés organiques puisque solubilisés dans l'extrait alors qu'ils sont adsorbés plus ou moins fortement sur les particules dans le cas d'une exposition aux $PM_{2.5-0.3}$.

Au Liban, le problème de la pollution atmosphérique devient une préoccupation majeure de santé publique, surtout en absence de nouvelles lois sur la qualité de l'air et/ou l'absence d'application des lois existantes qui permettraient de réduire les émissions, et par conséquent d'améliorer la qualité de l'air. Ainsi, comme nous l'avons démontré dans notre travail, les premières mesures à prendre devraient être tournées vers les moyens de transport, de manière à fluidifier le trafic et à réduire les émissions atmosphériques liées au trafic routier.

Plus globalement, les émissions de particules dans l'air sont réglementées dans la plupart des pays du monde, et portent sur les PM_{10} ou $PM_{2.5}$ alors qu'aucune réglementation n'a été définie pour les particules ultrafines. Nos résultats montrent que l'origine de la toxicité des $PM_{2.5}$ se situe majoritairement dans la fraction quasi-ultrafine, et suggèrent la nécessité d'une réglementation spécifique aux particules quasi-ultrafines. De plus, d'après nos résultats, la fraction organique semble avoir un effet plus délétère sur les cellules, d'où la recommandation de diminuer les émissions de composés organiques dans l'air.

Afin de compléter ces investigations *in vitro* et de conforter les résultats obtenus, il serait important d'évaluer la toxicité des familles de composés, par exemple en constituant des mélanges représentatifs des HAP, des N-HAP, des O-HAP, et voir quelle famille de composés serait la plus impliquée dans les effets toxiques observés. Durant ce travail, nous

avons commencé à évaluer l'induction de la voie de biotransformation des N- et O-HAP, en considérant 1 seul composé pour chaque famille : 1-Nitropyrene et la 9-Fluorèneone respectivement. Les résultats ont montré une très forte activation métabolique, même plus importante que celle induite par BaP, le témoin positif considéré pour les HAP, suggérant donc que ces composés interviennent fortement dans l'induction des mécanismes de toxicité (stress oxydant, inflammation, apoptose).

De plus, au cours de ce travail de thèse, nous avons évalué l'expression des biomarqueurs impliqués dans la génotoxicité cellulaire. Sachant que ces biomarqueurs ne représentent pas totalement l'effet génotoxique, il serait préférable d'aller plus loin dans l'étude de ce mécanisme en évaluant les cassures au niveau de l'ADN via les tests de micronoyaux et des comètes. Vu les résultats obtenus à propos de l'activation des voies autophagiques et apoptotiques, il conviendrait de s'intéresser davantage à la cinétique d'induction de ces deux mécanismes et déterminer notamment les doses et le temps d'exposition auxquels la cellule réagit via l'autophagie, avant d'entrer sur la voie de l'apoptose. Nous avons également montré que seuls les composés organiques, que ce soit au niveau des PM ou contenus dans l'extrait, déclenchaient l'activation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, après activation du récepteur AhR et induction de la transcription des CYP. La métabolisation de ces composés va conduire à la génération des ERO, et potentiellement aussi de composés plus toxiques que leurs molécules parents. Ainsi, une étude plus approfondie du rôle de l'Ahr dans l'activation métabolique des composés organiques peut être proposée. Il s'agirait alors de moduler la voie de métabolisation des composés via l'inhibition de l'AhR et d'évaluer par la suite son effet sur l'induction de l'expression des cytochromes (CYP1A1, CYP1B1) et les différents mécanismes de toxicité évalués dans cette étude (inflammation, stress oxydant, lésions oxydatifs et génotoxicité). Ceci permettrait d'élucider la relation entre métabolisation des composés organiques, surtout les HAPs et l'induction de la toxicité d'une façon AhR-dépendante.

Bien que les études toxicologiques présentent aussi des limites, dans la mesure où il est impossible de reconstituer au laboratoire la complexité de l'environnement humain, ni la complexité de l'appareil respiratoire avec les mécanismes de défense mis en jeu, elles demeurent cependant un des maillons essentiels parmi l'ensemble des éléments qui aboutissent à l'évaluation du risque. Dans les perspectives de ce travail, il serait donc important de faire évoluer le modèle cellulaire grâce au modèle MucilAirTM. L'épithélium mucilair est un modèle *in vitro* reconstitué en 3D de l'épithélium des voies respiratoires

humaines, qui possède, au contraire de la grande majorité des lignées cellulaires pulmonaires, une longue durée de vie. Ce modèle est formé de cellules humaines primaires isolées de la cavité nasale, de la trachée et des bronches et mises en culture à l'interface air-liquide. Une fois différencié, cet épithélium mime le tissu *in vivo* de l'épithélium respiratoire humain et reste fonctionnel durant plusieurs mois. L'utilisation du modèle MucilAirTM dans l'évaluation des effets toxiques nous permettrait donc de mieux comprendre les interactions entre les PM et/ou de leurs constituants et l'épithélium respiratoire, et donc de s'approcher au plus près de la réalité et de la complexité des voies respiratoires humaines (cils, mucus, différents types cellulaires et interactions entre les cellules). De plus, il nous permettrait de mimer l'exposition environnementale et donc d'étudier les effets toxiques d'une exposition chronique à faible dose.

Références bibliographiques:

- Aboutit, K., Scarabelli, T.M., McCauley, R.B., 2012. Autophagy in mammalian cells. *World J. Biol. Chem.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i1.1>
- Afif et al, C., 2008. SO₂ in Beirut: air quality implication and effects of local emissions and long-range transport | Request PDF [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/225848015_SO2_in_Beirut_air_quality_implication_and_effects_of_local_emissions_and_long-range_transport (accessed 9.25.18).
- Aggarwal, S., Mannam, P., Zhang, J., 2016. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 311, L433–L452. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00128.2016>
- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Albinet, A., 2006. Hydrocarbures aromatiques polycycliques et leurs dérivés nitrés et oxygénés dans l'air ambiant: caractérisation physico-chimique et origine 409.
- Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (South of France): Concentrations and sources. *Sci. Total Environ.* 384, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.028>
- Albinet, A., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E., Jaffrezo, J.-L., 2008. Nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys Part 2: Particle size distribution. *Atmos. Environ.* 42, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.008>
- Allen, J.O., Dookeran, N.M., Taghizadeh, K., Lafleur, A.L., Smith, K.A., Sarofim, A.F., 1997. Measurement of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with a Size-Segregated Urban Aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2064–2070. <https://doi.org/10.1021/es960894g>
- Anastasiya V. Snezhkina, Anna V. Kudryavtseva, Olga L. Kardymon, et al., “ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, Article ID 6175804, 17 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>.
- Angulo, R., Martínez, P., Jodral, M.L., 1999. PCB congeners transferred by human milk, with an estimate of their daily intake. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 37, 1081–1088.
- ANSES, 2019. Pollution de l'air : nouvelles connaissances sur les particules de l'air ambiant et l'impact du trafic routier | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- ATSDR - Toxicological Profile: Chloroform [WWW Document], 1997. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=53&tid=16> (accessed 7.4.19).

- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Baalbaki, R., El Hage, R., Nassar, J., Shihadeh, A., Saliba, N., Gerard, K., Saliba, N., Zaarour, R., Abboud, M., Farah, W., Khalaf Kairouz, L., 2016. Exposure to Atmospheric PMS, PAHS, PCDD/FS and Metals Near an Open Air Waste Burningsite in Beirut. *Leban. Sci. J.* 17, 91–103.
- Bamford, H.A., Baker, J.E., 2003. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region. *Atmos. Environ.* 37, 2077–2091. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00102-X)
- Becker, S., Dailey, L., Soukup, J.M., Silbajoris, R., Devlin, R.B., 2005. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.007>
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I.L., Nel, A., Peden, D., Diaz-Sanchez, D., Tarlo, S.M., Williams, P.B., Bernstein, J.A., 2004. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.08.030>
- Billet, S., Ledoux, F., Dagher, Z., Courcot, D., Garçon, G., Cazier, F., Shirali, P., Puskaric, E., Aboukais, A., 2007. Stability of organic compounds in atmospheric particulate matter and its relation with textural properties [WWW Document]. URL https://www.researchgate.net/publication/303088357_Stability_of_organic_compounds_in_atmospheric_particulate_matter_and_its_relation_with_textural_properties (accessed 7.21.19).
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense: *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Martin, P., Hachimi, A., Shirali, P., Greige-Gerges, H., Courcot, D., 2015. 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 205, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.027>
- Borgie, M., Ledoux, F., Dagher, Z., Verdin, A., Cazier, F., Courcot, L., Shirali, P., Greige-Gerges, H., Courcot, D., 2016. Chemical characteristics of PM_{2.5-0.3} and PM_{0.3} and consequence of a dust storm episode at an urban site in Lebanon. *Atmospheric Res.* 180, 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.06.001>
- Bortoli, S., Boutet-Robinet, E., Lagadic-Gossman, D., Huc, L., 2018. Nrf2 and AhR in metabolic reprogramming after contaminant exposure. *Curr. Opin. Toxicol.* 8, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.12.001>
- Brauer, M., Amann, M., Burnett, R.T., Cohen, A., Dentener, F., Ezzati, M., Henderson, S.B., Krzyzanowski, M., Martin, R.V., Van Dingenen, R., van Donkelaar, A., Thurston, G.D., 2012. Exposure Assessment for Estimation of the Global Burden of Disease Attributable to Outdoor Air Pollution. *Environ. Sci. Technol.* 46, 652–660. <https://doi.org/10.1021/es2025752>

- Cachon, B.F., Firmin, S., Verdin, A., Ayi-Fanou, L., Billet, S., Cazier, F., Martin, P.J., Aissi, F., Courcot, D., Sanni, A., Shirali, P., 2014. Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM_{>2.5}) collected from Cotonou, Benin. *Environ. Pollut.* 185, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.026>
- Carslaw, D.C., Ropkins, K., 2012. Openair - An R Package for Air Quality Data Analysis. *Env. Model Softw* 27–28, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.09.008>
- Cecinato, A., Guerriero, E., Balducci, C., Muto, V., 2014. Use of the PAH fingerprints for identifying pollution sources. *Urban Clim.* 10, 630–643. <https://doi.org/10.1016/j.uclim.2014.04.004>
- Chalupa, D.C., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Utell, M.J., Frampton, M.W., 2004. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ. Health Perspect.* 112, 879–882.
- Chandra, M., Panchatcharam, M., Miriyala, S., 2016. Biomarkers in ROS and Role of Isoprostanes in Oxidative Stress, in: Ahmad, R. (Ed.), *Free Radicals and Diseases*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64706>
- Chen, L.C., Lippmann, M., 2009. Effects of Metals within Ambient Air Particulate Matter (PM) on Human Health. *Inhal. Toxicol.* 21, 1–31. <https://doi.org/10.1080/08958370802105405>
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., Gibson, S.B., 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ.* 15, 171–182. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402233>
- Chen, Z.-H., Wu, Y.-F., Wang, P.-L., Wu, Y.-P., Li, Z.-Y., Zhao, Y., Zhou, J.-S., Zhu, C., Cao, C., Mao, Y.-Y., Xu, F., Wang, B.-B., Cormier, S.A., Ying, S.-M., Li, W., Shen, H.-H., 2016. Autophagy is essential for ultrafine particle-induced inflammation and mucus hyperproduction in airway epithelium. *Autophagy* 12, 297–311. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1124224>
- Chevallier, A., 2013. Etude du rôle du récepteur aux hydrocarbures aromatiques ou AhR dans le développement et l'homéostasie du système nerveux de la souris C57BL/6J 286.
- Chiba, T., Chihara, J., Furue, M., 2012. Role of the Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in the Pathology of Asthma and COPD. *J. Allergy* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/372384>
- Cianfanelli, V., D'Orazio, M., Cecconi, F., 2015. AMBRA1 and BECLIN 1 interplay in the crosstalk between autophagy and cell proliferation. *Cell Cycle* 14, 959–963. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1021526>
- Cooper, K., 2018. Till Death Do Us Part: The Marriage of Autophagy and Apoptosis. - PubMed - NCBI.
- Courter, L.A., Pereira, C., Baird, W.M., 2007. Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 625, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.05.005>
- Daouk, T., 2012. Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP.
- de Kok, T.M.C.M., Drieste, H.A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedé, J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent

- studies. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 613, 103–122. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2006.07.001>
- del Rosario Sienra, M., 2006. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., Ding, W., 2013a. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. In Vitro* 27, 1762–1770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., Ding, W., 2013b. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. In Vitro* 27, 1762–1770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2012. Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919. <https://doi.org/10.1021/tx200529v>
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F., Fimia, G.M., 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* 191, 155–168. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002100>
- Dietrich, C., 2016. Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Stem Cells Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7943495>
- Dimashki, M., 2000. Measurements of nitro-PAH in the atmospheres of two cities. *Atmos. Environ.* 34, 2459–2469. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00417-3](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00417-3)
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W., Stone, V., 2005. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* 2, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-10>
- Eller, N., Netterstrøm, B., Laursen, P., 1999. Risk of chronic effects on the central nervous system at low toluene exposure. *Occup. Med. Oxf. Engl.* 49, 389–395. <https://doi.org/10.1093/occmed/49.6.389>
- Eskelinen, E.-L., 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1, 1–10.
- Fang, C., Gu, L., Smerin, D., Mao, S., Xiong, X., 2017. The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8495160>
- Filley, C.M., Halliday, W., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., 2004. The effects of toluene on the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1–12. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.1.1>
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., Cecconi, F., 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125. <https://doi.org/10.1038/nature05925>

- Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J., 2001. Influence of Chemical and Biological Factors on Trophic Transfer of Persistent Organic Pollutants in the Northwater Polynya Marine Food Web. *Environ. Sci. Technol.* 35, 732–738. <https://doi.org/10.1021/es001459w>
- Fortoul, T.I., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Colin-Barenque, L., Bizarro-Nevaras, P., García-Peláez, I., Ustarroz-Cano, M., López-Zepeda, S., Cervantes-Yépez, S., López-Valdez, N., Meléndez-García, N., Espinosa-Zurutuza, M., Cano-Rodríguez, G.C.-G. and M.C., 2015. Health Effects of Metals in Particulate Matter. *Curr. Air Qual. Issues.* <https://doi.org/10.5772/59749>
- Fragkos, M., Jurvansuu, J., Beard, P., 2009. H2AX Is Required for Cell Cycle Arrest via the p53/p21 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2828–2840. <https://doi.org/10.1128/MCB.01830-08>
- Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K., 2010. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 40–53. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.40>
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X., 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 12297–12305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200>
- Garait, B., 2006. LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR VOIE METABOLIQUE (REGIMES ALIMENTAIRES) OU PAR VOIE GAZEUSE (HYPEROXIE) ET EFFET DE LA GLISODIN®.
- Genies, C., 2017. Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges, une classe majeure de polluants atmosphériques 267.
- Ghio, A.J., Stonehuerner, J., Dailey, L.A., Carter, J.D., 1999. Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress. *Inhal. Toxicol.* 11, 37–49. <https://doi.org/10.1080/089583799197258>
- Ghorani-Azam, A., Riahi-Zanjani, B., Balali-Mood, M., 2016. Effects of air pollution on human health and practical measures for prevention in Iran. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 21. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.189646>
- Global Burden of Disease (GBD) [WWW Document], 2014. . Inst. Health Metr. Eval. URL <http://www.healthdata.org/gbd> (accessed 7.11.19).
- Guaita, R., Pichiule, M., Maté, T., Linares, C., Díaz, J., 2011. Short-term impact of particulate matter (PM_{2.5}) on respiratory mortality in Madrid. *Int. J. Environ. Health Res.* 21, 260–274. <https://doi.org/10.1080/09603123.2010.544033>
- Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J.A., Perrone, M.G., Bolzacchini, E., Schwarze, P.E., Camatini, M., 2010. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro* 24, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.013>
- Gupta, P., Harger, W.P., Arey, J., 1996. The contribution of nitro- and methylnitronaphthalenes to the vapor-phase mutagenicity of ambient air samples. *Atmos. Environ.* 30, 3157–3166. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(96\)00024-6](https://doi.org/10.1016/1352-2310(96)00024-6)
- Halonen, J., Lanki, T., Yli-Tuomi, T., Tiittanen, P., Kulmala, M., Pekkanen, J., 2009. Particulate Air Pollution and Acute Cardiorespiratory Hospital Admissions and

- Mortality Among the Elderly. *Epidemiology* 20, 143–153.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31818c7237>
- Hamra, G.B., Laden, F., Cohen, A.J., Raaschou-Nielsen, O., Brauer, M., Loomis, D., 2015. Lung Cancer and Exposure to Nitrogen Dioxide and Traffic: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* 123, 1107–1112.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1408882>
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., Mizushima, N., 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>
- Huang, B., Liu, M., Bi, X., Chaemfa, C., Ren, Z., Wang, X., Sheng, G., Fu, J., 2014. Phase distribution, sources and risk assessment of PAHs, NPAHs and OPAHs in a rural site of Pearl River Delta region, China. *Atmospheric Pollut. Res.* 5, 210–218.
<https://doi.org/10.5094/APR.2014.026>
- IARC, 2013, 2014. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes. International Agency for Research on Cancer, Place of publication not identified.
- Jung, M.H., Kim, H.R., Park, Y.J., Park, D.S., Chung, K.H., Oh, S.M., 2012. Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 749, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.002>
- Kandyala, R., Raghavendra, S.P.C., Rajasekharan, S.T., 2010. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* 14, 1–5.
<https://doi.org/10.4103/0973-029X.64299>
- Karlsson, H.L., Nygren, J., Möller, L., 2004. Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell–particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 565, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.07.015>
- Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos. Environ.* 60, 504–526.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>
- Kerkvliet, N.I., 2009. AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* 77, 746–760.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.021>
- Keyte, I.J., Harrison, R.M., Lammel, G., 2013. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Chem. Soc. Rev.* 42, 9333–9391. <https://doi.org/10.1039/C3CS60147A>
- Kim, J., Cha, Y.-N., Surh, Y.-J., 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res.* 690, 12–23.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.09.007>
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>

- Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>
- Kim, M.J., Pelloux, V., Guyot, E., Tordjman, J., Bui, L.-C., Chevallier, A., Forest, C., Benelli, C., Clément, K., Barouki, R., 2012. Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ. Health Perspect.* 120, 508–514. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104282>
- Klionsky, D.J. (Ed.), 2009. Autophagy in mammalian systems. Pt. B: ..., *Methods in enzymology*. Elsevier, Acad. Press, Amsterdam.
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 317–326. <https://doi.org/10.1023/A:1015970023889>
- Korashy, H.M., El-Kadi, A.O.S., 2005. Regulatory Mechanisms Modulating the Expression of Cytochrome P450 1A1 Gene by Heavy Metals. *Toxicol. Sci.* 88, 39–51. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi282>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., Nomenclature Committee on Cell Death 2009, 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2010. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host Microbe* 8, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.007>
- Landes, T., 2009. Dynamique mitochondriale et apoptose : rôle de l'interaction entre Opa1 et Bnip3 (thesis). Toulouse 3.
- Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N.F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E., Zhang, D.D., 2010. A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3275–3285. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>
- Lauwerys, B.R., Houssiau, F.A., 2003. Involvement of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 520, 237–251.
- Lawal, A.O., 2017. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicol. Lett.* 270, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.01.017>
- Lawrence, B.P., Kerkvliet, N.I., Kerkvliet, N.I., 2006. Immune Modulation by TCDD and Related Polyhalogenated Aromatic Hydrocarbons [WWW Document]. *Immunotoxicol. Immunopharmacol.* <https://doi.org/10.1201/9781420005448-23>
- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E.M., Alleman, L.Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B.M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., Garçon, G., 2016. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environ. Pollut.* 218, 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>

- Ledoux, F., Courcot, L., Courcot, D., Aboukaïs, A., Puskaric, E., 2006. A summer and winter apportionment of particulate matter at urban and rural areas in northern France. *Atmospheric Res.*, 16th International Conference on Nucleation and Atmospheric Aerosols 82, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2006.02.019>
- Lee, R.C., Ambros, V., 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862–864. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Lelieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Daiber, A., Münzel, T., 2019. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur. Heart J.* <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz135>
- Letcher, R.J., Bustnes, J.O., Dietz, R., Jenssen, B.M., Jørgensen, E.H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M.M., Gabrielsen, G.W., 2010. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Sci. Total Environ.* 408, 2995–3043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.038>
- Liu, T., Wu, B., Wang, Y., He, H., Lin, Z., Tan, J., Yang, L., Kamp, D.W., Zhou, X., Tang, J., Huang, H., Zhang, L., Bin, L., Liu, G., 2015. Particulate matter 2.5 induces autophagy via inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin kinase signaling pathway in human bronchial epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* 12, 1914–1922. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3577>
- Liu, Y., Sklorz, M., Schnelle-Kreis, J., Orasche, J., Ferge, T., Kettrup, A., Zimmermann, R., 2006. Oxidant denuder sampling for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in ambient aerosol: evaluation of sampling artefact. *Chemosphere* 62, 1889–1898. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.049>
- Liu, Z., Wu, X., Zhang, F., Han, L., Bao, G., He, X., Xu, Z., 2013. AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma. *J. Mol. Histol.* 44, 455–461. <https://doi.org/10.1007/s10735-013-9495-6>
- Longhin, E., Gualtieri, M., Capasso, L., Bengalli, R., Mollerup, S., Holme, J.A., Øvrevik, J., Casadei, S., Di Benedetto, C., Parenti, P., Camatini, M., 2016. Physico-chemical properties and biological effects of diesel and biomass particles. *Environ. Pollut.* 215, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.015>
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghisssassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70487-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X)
- Ludewig, G., Lehmann, L., Esch, H., Robertson, L.W., 2008. Metabolic Activation of PCBs to Carcinogens in Vivo – A Review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.10.029>
- Luebke, R.W., Copeland, C.B., Daniels, M., Lambert, A.L., Gilmour, M.I., 2001. Suppression of allergic immune responses to house dust mite (HDM) in rats exposed to 2,3,7,8-TCDD. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 62, 71–79. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.1.71>
- Mandal, P.K., 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. [B]* 175, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0483-3>

- Marino, F., Cecinato, A., Siskos, P.A., 2000. Nitro-PAH in ambient particulate matter in the atmosphere of Athens. *Chemosphere* 40, 533–537. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00308-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00308-2)
- Martin, R., Desponds, C., Eren, R.O., Quadroni, M., Thome, M., Fasel, N., 2016. Caspase-mediated cleavage of raptor participates in the inactivation of mTORC1 during cell death. *Cell Death Discov.* 2, 16024. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.24>
- Mascanfroni, I.D., Takenaka, M.C., Yeste, A., Patel, B., Wu, Y., Kenison, J.E., Siddiqui, S., Basso, A.S., Otterbein, L.E., Pardoll, D.M., Pan, F., Priel, A., Clish, C.B., Robson, S.C., Quintana, F.J., 2015. Metabolic control of type 1 regulatory (Tr1) cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 21, 638–646. <https://doi.org/10.1038/nm.3868>
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., Yoshimori, T., 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* 190, 511–521. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911141>
- Matthias-Maser, S., Jaenicke, R., 2000. The size distribution of primary biological aerosol particles in the multiphase atmosphere. *Aerobiologia* 16, 207–210. <https://doi.org/10.1023/A:1007607614544>
- Mazzuca, G.M., Ren, X., Loughner, C.P., Estes, M.D., Crawford, J.H., Pickering, K.E., Weinheimer, A.J., Dickerson, R.R., 2016. Interactive comment on “Ozone Production and Its Sensitivity to NO_x and VOCs: Results from the DISCOVER-AQ Field Experiment, Houston 2013.” <https://doi.org/10.5194/acp-16-14463-2016>
- Michael, S., Montag, M., Dott, W., 2013. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter. *Environ. Pollut.* 183, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.026>
- Milne, G.L., Yin, H., Hardy, K.D., Davies, S.S., Roberts, L.J., 2011. Isoprostane Generation and Function. *Chem. Rev.* 111, 5973–5996. <https://doi.org/10.1021/cr200160h>
- Minutolo, P., Sgro, L., Costagliola, M.A., Prati, M.V., Sirignano, M., D’Anna, A., 2010. Ultrafine particle emission from combustion devices burning natural gas 6.
- Monn, C., Becker, S., 1999. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 245–252. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8591>
- Murakami, M., Yamada, J., Kumata, H., Takada, H., 2008. Sorptive Behavior of Nitro-PAHs in Street Runoff and Their Potential as Indicators of Diesel Vehicle Exhaust Particles. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1144–1150. <https://doi.org/10.1021/es071904o>
- Nakashima, A., Higashisaka, K., Kusabiraki, T. et al. Autophagy is a new protective mechanism against the cytotoxicity of platinum nanoparticles in human trophoblasts. *Sci Rep* 9, 5478 (2019) doi:10.1038/s41598-019-41927-2
- Nakhlé, M.M., Farah, W., Ziadé, N., Abboud, M., Salameh, D., Annesi-Maesano, I., 2015. Short-term relationships between emergency hospital admissions for respiratory and cardiovascular diseases and fine particulate air pollution in Beirut, Lebanon. *Environ. Monit. Assess.* 187, 196. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4409-6>
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., Franco, R., 2014. Oxidative Stress, Redox

- Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 66–85. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5837>
- Ndong Ba, A., Cazier, F., Verdin, A., Garcon, G., Cabral, M., Courcot, L., Diouf, A., Courcot, D., Gualtieri, M., Fall, M., 2019. Physico-chemical characterization and in vitro inflammatory and oxidative potency of atmospheric particles collected in Dakar city's (Senegal). *Environ. Pollut.* 245, 568–581. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.026>
- Nfon, E., Cousins, I.T., 2006. Interpreting time trends and biomagnification of PCBs in the Baltic region using the equilibrium lipid partitioning approach. *Environ. Pollut.* 144, 994–1000. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.042>
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B., 2003. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140229>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- OMS, 2018. WHO | WHO Global Ambient Air Quality Database (update 2018) [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/airpollution/data/cities/en/> (accessed 12.4.18).
- Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G.J., Miller, C.L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W., Platten, M., 2011. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>
- Pedersen, D.U., Durant, J.L., Taghizadeh, K., Hemond, H.F., Lafleur, A.L., Cass, G.R., 2005. Human Cell Mutagens in Respirable Airborne Particles from the Northeastern United States. 2. Quantification of Mutagens and Other Organic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9547–9560. <https://doi.org/10.1021/es050886c>
- Peel, J.L., Tolbert, P.E., Klein, M., Metzger, K.B., Flanders, W.D., Todd, K., Mulholland, J.A., Ryan, P.B., Frumkin, H., 2005. Ambient air pollution and respiratory emergency department visits. *Epidemiol. Camb. Mass* 16, 164–174.
- Perez, L., Tobías, A., Querol, X., Pey, J., Alastuey, A., Díaz, J., Sunyer, J., 2012. Saharan dust, particulate matter and cause-specific mortality: A case–crossover study in Barcelona (Spain). *Environ. Int.* 48, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.07.001>
- Poland, A., Palen, D., Glover, E., 1982. Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice. *Nature* 300, 271–273. <https://doi.org/10.1038/300271a0>
- Pope III, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287, 1132–1141.
- Prahalad, A.K., Inmon, J., Dailey, L.A., Madden, M.C., Ghio, A.J., Gallagher, J.E., 2001. Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 879–887. <https://doi.org/10.1021/tx010022e>

- Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.031>
- Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, H.L., 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71. <https://doi.org/10.1038/nature06880>
- Quintana, F.J., Murugaiyan, G., Farez, M.F., Mitsdoerffer, M., Tukupah, A.-M., Burns, E.J., Weiner, H.L., 2010. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20768–20773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009201107>
- Ramos de Rainho, C., Machado Corrêa, S., Luiz Mazzei, J., Alessandra Fortes Aiub, C., Felzenszwalb, I., 2013. Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitro-Derived in Respirable Airborne Particulate Matter Collected from Urban Areas of Rio de Janeiro (Brazil). *BioMed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/765352>
- Ravindra, K., Sokhi, R., Vangrieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Ringuet, J., Leoz-Garziandia, E., Budzinski, H., Villenave, E., Albinet, A., 2012. Particle size distribution of nitrated and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs and OPAHs) on traffic and suburban sites of a European megacity: Paris (France). *Atmospheric Chem. Phys.* 12, 8877–8887. <https://doi.org/10.5194/acp-12-8877-2012>
- Roberts, R., Ktistakis, N.T., 2013. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays Biochem.* 55, 17–27. <https://doi.org/10.1042/bse0550017>
- Rogers, S., de Souza, A.R., Zago, M., Iu, M., Guerrina, N., Gomez, A., Matthews, J., Baglolle, C.J., 2017. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep40539>
- Ryter, S.W., Choi, A.M.K., 2015. Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics. *Redox Biol.* 4, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.010>
- Sapkota, A., Symons, J.M., Kleissl, J., Wang, L., Parlange, M.B., Ondov, J., Breyse, P.N., Diette, G.B., Eggleston, P.A., Buckley, T.J., 2005. Impact of the 2002 Canadian forest fires on particulate matter air quality in Baltimore city. *Environ. Sci. Technol.* 39, 24–32.
- Schaumann, F., Borm, P.J.A., Herbrich, A., Knoch, J., Pitz, M., Schins, R.P.F., Luettig, B., Hohlfeld, J.M., Heinrich, J., Krug, N., 2004. Metal-rich Ambient Particles (Particulate Matter_{2.5}) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 898–903. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-423OC>
- Schwarze, P.E., Ovrevik, J., Låg, M., Refsnes, M., Nafstad, P., Hetland, R.B., Dybing, E., 2006. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 559–579. <https://doi.org/10.1177/096032706072520>
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E., 2014. Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and*

- Toxicology Volume 232. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–44.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_1
- Shao, J., Wheeler, A.J., Chen, L., Strandberg, B., Hinwood, A., Johnston, F.H., Zosky, G.R., 2018. The pro-inflammatory effects of particulate matter on epithelial cells are associated with elemental composition. *Chemosphere* 202, 530–537.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.052>
- Shertzer, H.G., Clay, C.D., Genter, M.B., Schneider, S.N., Nebert, D.W., Dalton, T.P., 2004. Cyp1a2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.013>
- Showkat, Ahmad & Bhat, Dr. showkat & Hassan, Tehseen & Majid, Sabhiya. (2019). Heavy Metal Toxicity And Their Harmful Effects On Living Organisms-A Review. 10.32553/Jmsdr.
- Shivanna, B., Jiang, W., Wang, L., Couroucli, X.I., Moorthy, B., 2011. Omeprazole Attenuates Hyperoxic Lung Injury in Mice via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Is Associated with Increased Expression of Cytochrome P4501A Enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 106–114. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.182980>
- Stolz, A., Ertych, N., Bastians, H., 2011. Tumor Suppressor CHK2: Regulator of DNA Damage Response and Mediator of Chromosomal Stability. *Clin. Cancer Res.* 17, 401–405. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1215>
- Su, J.-M., Lin, P., Chang, H., 2013. Prognostic value of nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 33, 3953–3961.
- Tackey, E., Lipsky, P.E., Illei, G.G., 2004. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 339–343.
<https://doi.org/10.1191/0961203304lu1023oa>
- Tarkowski, M., Kur, B., Nocuń, M., Sitarek, K., 2010. Perinatal exposure of mice to TCDD decreases allergic sensitisation through inhibition of IL-4 production rather than T regulatory cell-mediated suppression. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 23, 75–83.
<https://doi.org/10.2478/v.10001-010-0006-7>
- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., Klionsky, D.J., 2001. Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J. Biol. Chem.* 276, 2083–2087.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000739200>
- Tomaz, S., 2015. Etude des composés polyaromatiques dans l’atmosphère: caractérisation moléculaire et processus réactionnels en lien avec l’aérosol organique (Thèse de doctorat). Université de Bordeaux, 2014-....., France.
- Tu, J., Inthavong, K., Ahmadi, G., 2013. The Human Respiratory System, in: *Computational Fluid and Particle Dynamics in the Human Respiratory System*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 19–44. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4488-2_2
- US EPA, 2018. Air Quality and Climate Change Research [WWW Document]. US EPA. URL <https://www.epa.gov/air-research/air-quality-and-climate-change-research> (accessed 6.2.19).
- US EPA, 2015. Visibility and Regional Haze [WWW Document]. US EPA. URL <https://www.epa.gov/visibility> (accessed 5.31.19).

- US EPA, O., 2016a. Sulfur Dioxide Basics [WWW Document]. US EPA. URL <https://www.epa.gov/so2-pollution/sulfur-dioxide-basics> (accessed 6.28.19).
- US EPA, O., 2016b. Health Effects of Ozone in the General Population [WWW Document]. US EPA. URL <https://www.epa.gov/ozone-pollution-and-your-patients-health/health-effects-ozone-general-population> (accessed 6.28.19).
- US EPA, O., 2015. Learn about Polychlorinated Biphenyls (PCBs) [WWW Document]. US EPA. URL <https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcbs> (accessed 7.12.18).
- Velali, E., Papachristou, E., Pantazaki, A., Besis, A., Samara, C., Labrianidis, C., Lialiaris, T., 2018. In vitro cellular toxicity induced by extractable organic fractions of particles exhausted from urban combustion sources - Role of PAHs. *Environ. Pollut.* 243, 1166–1176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.075>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Stockinger, B., 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature06881>
- Veranth, J.M., Reilly, C.A., Veranth, M.M., Moss, T.A., Langelier, C.R., Lanza, D.L., Yost, G.S., 2004. Inflammatory Cytokines and Cell Death in BEAS-2B Lung Cells Treated with Soil Dust, Lipopolysaccharide, and Surface-Modified Particles. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 82, 88–96. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh248>
- Walgraeve, C., Demeestere, K., Dewulf, J., Zimmermann, R., Van Langenhove, H., 2010. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: molecular characterization and occurrence. *Atmos. Environ.* 44, 1831–1846. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.004>
- WANG, W., JARIYASOPIT, N., SCHRLAU, J., JIA, Y., TAO, S., YU, T.-W., DASHWOOD, R.H., ZHANG, W., WANG, X., SIMONICH, S.L.M., 2011. Concentration and Photochemistry of PAHs, NPAHs, and OPAHs and Toxicity of PM_{2.5} during the Beijing Olympic Games. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6887–6895. <https://doi.org/10.1021/es201443z>
- Wilson, N.K., McCurdy, T.R., Chuang, J.C., 1995. Concentrations and phase distributions of nitrated and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. *Atmos. Environ.* 29, 2575–2584. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(95\)00189-6](https://doi.org/10.1016/1352-2310(95)00189-6)
- Wolfe, A.H., Patz, J.A., 2002. Reactive Nitrogen and Human Health: Acute and Long-term Implications. *AMBIO J. Hum. Environ.* 31, 120–125. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.120>
- Wong, P.S., Vogel, C.F., Kokosinski, K., Matsumura, F., 2010. Arylhydrocarbon Receptor Activation in NCI-H441 Cells and C57BL/6 Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 210–217. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0228OC>
- Xu, J., Wise, J.T.F., Wang, L., Schumann, K., Zhang, Z., Shi, X., 2017. Dual Roles of Oxidative Stress in Metal Carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 36, 345–376. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2017025229>
- Yassaa, N., Meklati, B.Y., Cecinato, A., Marino, F., 2001. Organic Aerosols in Urban and Waste Landfill of Algiers Metropolitan Area: Occurrence and Sources. *Environ. Sci. Technol.* 35, 306–311. <https://doi.org/10.1021/es991316d>

- You, M., Savaraj, N., Kuo, M.T., Wangpaichitr, M., Varona-Santos, J., Wu, C., Nguyen, D.M., Feun, L., 2013. TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation. *Mol. Cell. Biochem.* 374, 181–190. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1518-1>
- Zhang, L., Wang, K., Lei, Y., Li, Q., Nice, E.C., Huang, C., 2015. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.030>
- Zhang, Q., Jimenez, J.L., Canagaratna, M.R., Allan, J.D., Coe, H., Ulbrich, I., Alfarra, M.R., Takami, A., Middlebrook, A.M., Sun, Y.L., Dzepina, K., Dunlea, E., Docherty, K., DeCarlo, P.F., Salcedo, D., Onasch, T., Jayne, J.T., Miyoshi, T., Shimo, A., Hatakeyama, S., Takegawa, N., Kondo, Y., Schneider, J., Drewnick, F., Borrmann, S., Weimer, S., Demerjian, K., Williams, P., Bower, K., Bahreini, R., Cottrell, L., Griffin, R.J., Rautiainen, J., Sun, J.Y., Zhang, Y.M., Worsnop, D.R., 2007. Ubiquity and dominance of oxygenated species in organic aerosols in anthropogenically-influenced Northern Hemisphere midlatitudes. *Geophys. Res. Lett.* 34. <https://doi.org/10.1029/2007GL029979>
- Zhou, C., ZHU, X., WANG, Z., MA, X., CHEN, J., NI, Y., WANG, W., MU, J., LI, X., 2013. Gas-Particle Partitioning of PAHs In The Urban Air of Dalian, China: Measurements and Assessments. *Polycycl. Aromat. Compd.* 33, 31–51. <https://doi.org/10.1080/10406638.2012.683467>

ANNEXE 1

REVIEW : POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DERIVATIVES IN AIRBORNE PARTICULATE MATTER: SOURCES, ANALYSIS AND TOXICITY.

Abbas I., **Badran G**, Verdin A., Ledoux F., Roumie M., Lo Guidice Jm., Courcot D., Garçon G. 2018. Environmental Chemistry Letters, 16: 439. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0> (Annexe 1).

[Click here to view linked References](#)

PAHs and their derivative compounds in airborne particulate matter:

Sources, analysis and toxic effects – A review

Imane ABBAS^{1,*}, Ghidaa BADRAN^{1,2,3}, Anthony VERDIN², Frédéric LEDOUX², Mohamed ROUMIE¹,
Dominique COURCOT² and Guillaume GARÇON³

(¹) Lebanese Atomic Energy Commission – NCSR, Beirut, Lebanon

(²) Univ. Littoral Côte d'Opale, EA4492-UCEIV, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, Dunkerque, France

(³) Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, France

* Corresponding author, E-mail address: imane.abbas@cnrs.edu.lb

Abstract: PAHs are pollutants produced during incomplete combustion and pyrolysis of organic substances and are encountered worldwide. PAHs derivatives such as nitrated PAHs (N-PAHs), oxygenated PAHs (O-PAHs), hydroxylated PAHs (OH-PAHs), sulfur heterocycles PAHs (PASHs), are components with hydrogen on the aromatic ring substituted by carbonyl-, nitro- and hydroxyl- functional groups (N-PAHs, O-PAHs or OH-PAHs) or a group of heterocyclic PAHs containing one sulfur atom in place of a carbon atom in the aromatic ring (PASHs). PAHs and their derivatives such as nitrated PAHs (N-PAHs), oxygenated PAHs (O-PAHs), hydroxylated PAHs (OH-PAHs), sulfur heterocycles PAHs (PASHs), can also be introduced in the atmosphere directly in this form as primary pollutants or formed through several homogenous and heterogeneous oxidation reactions. During the last decades, interest on studying PAH derivatives was increasing as they are considered more harmful than parent's compounds. PAH derivatives are detected in the atmospheric particulate matter in numerous cities worldwide. It is known that PAH derivatives can interfere with living organisms by several ways including inhalation, oral ingestion and dermal contact. Many in-vivo and in-vitro studies have shown the toxic effects of PAH derivatives notably those present in airborne particles and diesel exhausts particles. This review aims to gather information published in the recent literature regarding PAH derivatives from their mechanisms of formation and their physico-chemical characteristics up to the different methods for their determination and quantification as well as their occurrence in the atmosphere depending on the region of world and their adverse health effects.

Keywords: N-PAHs, O-PAHs, OH-PAHs, PASHs, Particulate Matter, Toxicity

1
2
3
4
5
6 **Abbreviations:**
7

8 AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor

9 APSE Accelerated/Pressurized Solvent Extraction

10 B[a]P: Benzo[a]Pyrene

11 CLD: Chemi-Luminescence Detector

12 CPAHs: Combustion-related PAHs

13 DPM: Diesel Particulate Matter

14 ECD: Electron Capture Detector

15 GC-EI/MS: gas chromatography- Electron Impact/Mass Spectrometry

16 GC: Gas Chromatography

17 HFBA: Hepta Fluoro Butyric Anhydride

18 HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

19 LC-APCI/MS: Liquid Chromatography - Atmospheric Pressure Chemical Ionization/ Mass Spectrometry

20 LOH: Loss of Heterozygosity

21 MAE: Microwave Assisted Extraction

22 MAE: Microwave-Assisted Extraction

23 MDA: Malonaldehyde

24 MN: MicroNuclei

25 MS: Mass Spectrometry

26 N-PAHs: nitrated PAHs,

27 NA: Nuclear Abnormalities

28 NCD: Nitrogen Chemiluminescence Detector

29 NCI-MS: Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry

30 NICI: Negative Ion Chemical Ionisation

31 NPD: Nitrogen and Phosphorus selective Detector

32 O-PAHs: Oxygenated PAHs

33 Oct-4: Octamer-4

34 OH-PAHs: hydroxylated PAHs

35 PASHs: sulfur heterocycles PAHs

36 PFE: Pressurized-Fluid Extraction

37 PM : Particulate Matter

38 QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe

39 SE: Solvent extraction,

40 SFE: Supercritical Fluid Extraction

41 SIM: Selective Ion Monitoring

42 TID: Thermionic Ionization Detector

43 TPAHs: Total PAHs

44 TSP: Total Suspended particles

45 UE: Ultrasonic Extraction

46 USEPA: United States Environmental Protection Agency

47 XME: Xenobiotic-Metabolizing Enzyme

48 XRE: Xenobiotic Element Response

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Contents

1. Introduction..... 1

2. Sources and emissions of PAHs and their derivatives 2

 2.1.Origin of PAHs..... 2

 2.2. Formation of PAHs..... 5

 2.3. Formation of PAHs derivatives (N-PAHs, O-PAHs, PASHs and OH-PAHs)..... 6

3. PAHs derivatives in atmosphere..... 9

4. Analysis of PAHs derivatives in particles 13

5. Toxicological effects of PAHs derivatives..... 16

 5.1.Toxicity of PAHs 16

 5.2.Toxicity of N-PAHs 19

 5.3. Toxicity of O-PAHs..... 22

 5.4. Toxicity of OH-PAHs and PASHs..... 24

6. Conclusion..... 25

1. Introduction

Since the industrial revolution, anthropogenic activities and the increasing use of fossil fuels were the main causes of air pollution (Falcon-Rodriguez *et al.* 2016). Nowadays, air pollution-derived particulate matter (PM) constitutes a major public health problem as it is responsible for several hundreds of thousands premature deaths and the loss of millions of dollars yearly (A.Q. Europe 2016). Fine particles (PM_{2.5}) constitute a heterogeneous mixture of organic and inorganic compounds, originating from natural and anthropogenic sources. Chemical composition of PM_{2.5} varies as a function of location and season depending on the diversity of sources and the effects of atmospheric processes. In 2013, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified PM and outdoor air pollution as carcinogenic to Humans (group 1) (Loomis *et al.* 2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are lipophilic chemical compounds containing carbon and hydrogen atoms and at least two aromatic rings that have been classified as Toxic Persistent Substances (TPS) by the Agency for Toxic Substances (ATSDR, 2009). PAHs containing two or three aromatic rings are mainly present in the gas phase in the atmosphere, while PAHs with more than three aromatic rings, are predominantly associated to PM.

PAHs derivatives such as nitrated PAHs (N-PAHs), oxygenated PAHs (O-PAHs), hydroxylated PAHs (OH-PAHs), sulfur heterocycles PAHs (PASHs), are components with hydrogen on the aromatic ring substituted by carbonyl-, nitro- and hydroxyl- functional groups (N-PAHs, O-PAHs or OH-PAHs) or a group of heterocyclic PAHs containing one sulfur atom in place of a carbon atom in the aromatic ring (PASHs) (Wei *et al.* 2015). PAHs and their derivatives are mainly emitted from pyrogenic, petrogenic, biogenic and diagenic sources and are formed during incomplete combustion of fossil fuels, natural gas, wood, coke, organic waste. They are also related to tobacco smoke, geological processes and biogenic precursors like plant terpenes and found in sediments (Hayakawa *et al.* 2014; Shuzhen *et al.* 2007; Miet *et al.* 2009 a; Crane *et al.* 2010). Unsurprisingly, human activities are the most important source of pyrogenic and petrogenic PAHs. PAHs derivatives can be introduced as primary pollutants in the atmosphere (*i.e.*, also directly emitted in this form) or can result from various reactions between PAHs and other air pollutants. Several photochemical reactions occurring in the atmosphere and involving

1 oxidants (*e.g.*, OH, NO₃, SO₂, O₃, and NH₂) can lead to the formation of substituted PAH derivatives,
2
3 such as nitrated-PAHs (N-PAHs), oxygenated-PAHs (O-PAHs), sulfur heterocycles PASHs (thia-PAHs
4
5 or thia-arenes), hydroxylated PAHs (OH-PAHs) and azaarenes, in which nitrogen replaces a carbon in
6
7 one of the aromatic rings (Shuzhen *et al.* 2007; Albinet *et al.* 2008a).
8
9

10 The present article is a comprehensive review of published literature on PAHs and their
11
12 derivatives (*i.e.*, N-PAHs, O-PAHs, OH-PAHs and PASHs) in journals, books or governmental reports. It
13
14 develops the physico-chemicals characteristics of PAHs and their derivatives that can be found in
15
16 atmosphere, in gaseous or particulate phases. It also aims to describe the formation of secondary PAHs in
17
18 atmosphere, their methods of determination and quantification, and their occurrence and concentration in
19
20 the air of some countries. As derivatives can have higher toxicity than their respective parent's PAHs,
21
22 their adverse health effects and molecular mechanisms in *in-vitro* and *in-vivo* models will be described.
23
24
25
26
27
28
29

30 **2. Sources and emissions of PAHs and their derivatives**

31 2.1. Origin of PAHs

32
33 PAHs are pollutants produced during incomplete combustion and pyrolysis of organic substances,
34
35 such as fossil fuels, wood, and from the release of petroleum products. PAHs can be emitted by natural
36
37 and anthropogenic sources. Natural sources do not significantly contribute to overall PAH emissions
38
39 (Maliszewska-Kordybach 1999). Non-anthropogenic forest fires, woodland, and volcanic eruptions
40
41 constitute the main terrestrial sources of PAH. Some cosmic sources of PAHs have also been proposed.
42
43 Anthropogenic emissions of PAHs are predominantly coming from domestic, mobile and industrial
44
45 sources. Domestic emissions are associated with the burning of coal, fuels, crude oil, gas, garbage, or
46
47 other organic substances such as tobacco and plant materials (Zhang *et al.* 2009). Incomplete combustion
48
49 of coal constitutes the major source of PAHs. Mobile sources include the emission from transportation
50
51 (*e.g.*, vehicles, aircraft, and railways). Paturel *et al.*, in 1996, have shown that the start of vehicles with
52
53 engine in hot and cold conditions influenced the repartition of PAHs between the gaseous and particulate
54
55 phase (Paturel *et al.* 1996). In rail transportation, the use of diesel and diesel/electric locomotives is the
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 main source of PAHs. The most important industrial sources of PAHs include primary aluminum
2
3 production, iron and steel production, cement manufacture and asphalt industries. Moreover, burning of
4
5 agricultural waste constitutes also an important source of PAHs. PAHs have been reported to be emitted
6
7 in large amounts during biomass combustion, and significantly higher PAH emissions from softwood
8
9 than those for hardwood have been observed. Several studies have shown that combustion conditions can
10
11 influence PAHs emissions, and several authors have observed that emissions from traditional appliances
12
13 may be up to 145 times higher than those observed for automatic stoves (Vicente *et al.* 2016; Vicente *et*
14
15 *al.* 2018; Gonçalves *et al.* 2011; Leskinen *et al.* 2014). Half-life of atmospheric PAHs vary from hours to
16
17 weeks, and after emissions (Figure 1). PAHs are also widely dispersed in the atmosphere and can be
18
19 transported over long distances before being deposited by precipitations (rain-out or wash-out) on soil,
20
21 vegetation or water (Ravindra *et al.* 2008). PAHs are encountered in every air-based environment
22
23 including indoor and outdoor ones, even in the cleanest ones. Penetration of outdoor particles and vapor
24
25 phase PAHs into homes through windows, doors, cracks, coal or oil hearing system, fireplaces, and
26
27 ventilation system is the main origin of indoor PAHs (Chen *et al.* 2012; Shi *et al.* 2012; Vestenius *et al.*
28
29 2011). PAHs in the atmosphere result from combustion and/or volatilization and are present in
30
31 atmosphere as vapors or adsorbed to airborne particulate matter. Zhang *et al.* (2018), report that numerous
32
33 factors, such as ageing, emission sources, particle properties and meteorological conditions can influence
34
35 the gas-to-particle partitioning of PAHs derivatives. In this study 18 gaseous and particulate PAHs, 16 N-
36
37 PAHs, and 7 O-PAHs were analyzed at three locations in urban, marine and mountain site. Mass ratios
38
39 calculated in this study demonstrated that coal-burning emissions were the dominant source and the
40
41 PAHs were most aged at the mountain site (Zhang *et al.* 2018) Significant correlation has been observed
42
43 between the amounts of dust in atmosphere and the PAHs concentrations in the particulate phase (Kuo *et*
44
45 *al.* 2012). PAHs with 2-3 rings, characterized by low molecular mass are more volatile (high vapor
46
47 pressure) and are mainly present in vapor phase (Figure 2). In contrast, PAHs with 4 rings, with high
48
49 molecular mass have insignificant volatility (low vapor pressure) and are mainly present in particulate
50
51 phase (Kameda 2011). Environmental conditions can also play a crucial role in the gaseous and
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 particulate distribution. While during summer or in tropical regions, bigger quantity of PAHs is
2 transferred to vapor phase, in winter or in arctic regions, the reverse processes can be observed (Zhu *et al.*
3 2009).
4
5
6

7
8 The list of priority PAHs varies depending on the country. The most common studied PAHs are
9 the 16 listed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) (table 1). Atmospheric
10 concentrations of PAHs and the distribution between PAHs highly vary according to the characteristics of
11 the study site: industrial, urban, rural or residential areas. Table 3 summarizes PAHs recent concentrations
12 measured in ambient air and particles worldwide between 2010 and 2017 (Dat *et al.* 2017). Some
13 countries have included atmospheric PAHs level in air quality standards. In contrast, regulation regarding
14 the emissions of PAHs from stationary sources has not been established yet (Dat *et al.* 2017). Among the
15 16 PAHs listed by USEPA, Benzo[*a*]Pyrene (B[*a*]P) has been used as reference compound to regulate or
16 guideline the presence of PAHs in the atmosphere (Garrido *et al.* 2014). It has also been demonstrated
17 that concentrations of specific PAHs or group of PAHs can be used to identify the emission sources
18 (Ravindra *et al.* 2008; Ravindra *et al.* 2006 a; Ravindra *et al.* 2006 b). Many studies have also used PAHs
19 diagnostic ratios for evidencing a source category (Ravindra *et al.* 2006 a; Ravindra *et al.* 2006 b;
20 Kavouras *et al.* 2001; Mandalakis *et al.* 2002; Guo *et al.* 2003; Park *et al.* 2002; Oda *et al.* 2001; Fang *et al.*
21 2004; Landkocz *et al.* 2017; Borgie *et al.* 2015) and PAHs ratios were calculated and compared with
22 typical ones used as source indicators in the literature (Ravindra *et al.* 2008; Cecinato *et al.* 2014; Yunker
23 *et al.* 2002). Cazier *et al.* in 2016, suggest that from the concentrations data of PAHs in PM, it was
24 possible to calculate the ratio between Combustion-related PAHs (CPAHs: Fluoranthene, Pyrene,
25 Benzo[*a*]anthracene, chrysene, Benzo[*b*]fluoranthene, Benzo[*k*]fluoranthene, B[*a*]P,
26 Indeno[123*cd*]pyrene, Benzo[*ghi*]perylene) and Total PAHs (TPAHs), as an indicator of the extent in
27 which combustion sources contribute to PM (Cazier *et al.* 2016). Some PAHs concentration ratios can
28 remain constant during the transport in the atmosphere from the emission source, despite of the
29 physicochemical transformations occurring during the life of an atmospheric particle. This is the case of
30 isomers which have similar physicochemical properties and could be affected by oxidation or
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 photochemical phenomenon in an identical proportion (Guillon 2011). Ratios such as
2
3 fluoranthene/(fluoranthene + Pyrene) and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene indeno[1,2,3-*cd*]pyrene +
4
5 benzo[*g,h,i*]perylene) are of interest due to the photo-stability of such PAHs. In contrast, PAHs ratios
6
7 such as anthracene/ (anthracene + phenanthrene) or benzo[*a*]anthracene / (benzo[*a*]anthracene + chrysene)
8
9 must be considered with care since they use couple of isomers having different reactivity properties
10
11 according to photochemistry (Borgie *et al.* 2015).
12
13
14

15 The application of B[*a*]P toxic equivalent factor to PAHs concentrations can provide a more
16
17 accurate risk assessment for environmental exposure to PAHs. Jung *et al.* 2010 report some limitations
18
19 concerning this application. The potential risk of PAH exposure based on TEQ may be underestimated if
20
21 the interaction of some PAHs is synergistic rather than additive and chemical degradation of PAHs by
22
23 ambient oxidants in the atmosphere as well as on the filters during sampling could also underestimate the
24
25 potential risks due to reduced measured PAHs levels (Jung *et al.* 2010).
26
27
28
29
30
31

32 2.2. Formation of PAHs

33 Saturated hydrocarbon under deficient oxygen conditions lead mostly to the formation of PAHs.
34
35 While Haynes, in 1991, suggested three possible mechanisms of PAH formation during combustion, *i.e.*
36
37 slow Diels–Alder condensations, rapid radical reactions and ionic reaction mechanism (Haynes *et al.*
38
39 1991), Ravindra *et al.* (2008) proposed that only two main mechanisms (pyrosynthesis and pyrolysis) can
40
41 explain the formation of PAHs. At 500°C, Carbon-Hydrogen and Carbon-Carbon bond are broken to
42
43 form free radicals. These free radicals form acetylene which further condenses and forms aromatic rings.
44
45 The new formed molecules are resistant to thermal degradation (Figure 3) (Ravindra *et al.* 2008). Many
46
47 researchers suggest that airborne particulate PAHs originate from condensation of vapor phase, between
48
49 generation phase in the source and releasing into the environment. This theory was confirmed by Skjot-
50
51 Rasmussen in 2004. Depending on combustion conditions, the optimal temperature of PAH formation
52
53 during combustion process, determined by Mastral *et al.* (1996), was about 800 °C (Mastral *et al.* 1996).
54
55 Six mechanisms have been described by Bockhorn *et al.* (2009) to explain the formation of PAHs in the
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 particulate state, i.e. formation of molecular precursors of particles, nucleation or inception of particles
2
3 from heavy PAHs molecules, mass growth of particles by addition of gas phase molecules, coagulation
4
5 via reactive particle–particle collisions, carbonization of particulate material, and oxidation of PAHs
6
7 (Bockhorn 2007). Adsorption of PAHs into airborne PM depends from many factors: atmospheric
8
9 conditions, nature of the aerosol and properties of the individual PAHs (Zhang *et al.* 2009; Ravindra *et al.*
10
11 2008; Lima *et al.* 2005; Wang *et al.* 2013). Different studies have observed a correlation between the
12
13 presence of PAHs and the size of PM in atmosphere. PAHs are mainly associated with fine particles
14
15 (PM_{2.5}) compared to the coarse one (PM₁₀) (Manoli *et al.* 2002; Sanderson *et al.* 2005; Fang *et al.* 2006;
16
17 Oliveira *et al.* 2011; Sarti *et al.* 2017). Manoli *et al.* found that 95%-99% of 13 PAHs were detected in
18
19 PM₃, whereas Kong *et al.* reported the presence of 90% of the total particles-bound PAHs in PM_{2.5}
20
21 (Manoli *et al.* 2002; Kong *et al.* 2010). Two studies of Shen *et al.* have demonstrated that 69% and 80%
22
23 particulate-PAH is associated with PM_{2.5} (Shen *et al.* 2010; Shen *et al.* 2011). Wang *et al.* indicated in
24
25 their study that PAHs fraction increased in a significant manner in PM₁ (46.6 – 49.6%) and PM_{1-2.5} (30 –
26
27 33%) compared with those of PM_{2.5-10} (19.6–22.4%) (Wang *et al.* 2016a). Landkocz *et al.* have also
28
29 quantified PAHs levels in PM_{2.5} and in PM_{2.5-0.3}, collected in Dunkerque, a French coastal industrial city,
30
31 and they have found that 91% of the total PAH content in PM_{2.5} was associated with the quasi ultrafine
32
33 fraction (PM_{0.3}) (Landkocz *et al.* 2017). Landkocz *et al.* have demonstrated too, concerning PM_{0.3-2.5} and
34
35 PM_{2.5} that Combustion-PAHs versus Total-PAHs (CPAH/TPAH) ratio was 0.87 and 0.96 for PM_{2.5-0.3} and
36
37 PM_{2.5} respectively. A typical CPAH/TPAH ratio reference value is 0.7 for an urban area and 0.96 for a
38
39 highly industrialized area. Some studies have demonstrated that Σ -PAH/PM ratio in PM_{2.5} collected in
40
41 winter and summer varied from 6.5 to 125.8 while PAHs in PM_{2.5-10} had a ratio from 1.7 to 37.6 (Kong *et al.*
42
43 2010; Anastasopoulos *et al.* 2012). In 2014, Cecinato *et al.* investigated a group fingerprints and
44
45 concentration ratios between pairs of PAHs compounds in Northern, Central and Southern Italy, in order
46
47 to determine the major pollution source and they find that vehicles were confirmed as the principal source
48
49 of PAHs, with minor and season dependent contributions that could be associated to wood burning and
50
51 soil resuspension (Cecinato *et al.* 2014).
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.2. Formation of PAHs derivatives (N-PAHs, O-PAHs, PASHs and OH-PAHs)

In atmosphere, PAHs are subject to several physico, chemico- and photo-chemical reactions, leading to the formation of other PAHs derivatives such as N-PAHs, O-PAHs, PASHs, and OH-PAHs. PAHs derivatives can be emitted directly from the primary sources and formed secondarily through the reaction of parent's PAHs and atmospheric oxidants. PAHs and their derivatives constitute a group of thermally stable compounds. Table 2 shows some properties of main PAH derivatives. PAH derivatives (N-PAHs, O-PAHs, PASHs and OH-PAHs) are formed in the atmosphere through homogenous and heterogeneous oxidation reactions that lead to the formation of N-PAHs, O-PAHs, PASHs and OH-PAHs. PAHs derivatives are also emitted directly from sources as primary pollutant together with parent's PAHs during incomplete combustion and pyrolysis of fossil fuels and biomass (Atkinson *et al.* 2007; Keyte *et al.* 2013; Chen *et al.* 2015; Karavalakis *et al.* 2010; Nalin *et al.* 2016; Bandowe *et al.* 2017). Three different processes can lead to N-PAHs formation from parent PAHs. They can indeed be formed (i) by electrophilic nitration during combustion *e.g.* exhaust gas of diesel or gasoline vehicles, wood burning, and cooking, (ii) in the atmosphere, by gas phase reactions, and (iii) by heterogeneous oxidation of particle-bound PAHs. In general, N-PAHs with 2 to 4 benzene rings are formed by gas-phase reactions of PAHs with atmospheric oxidants. Gas-phase reactions differ between day and night time. While during daytime, hydroxyl radicals ($^{\circ}\text{OH}$), generated by the photolysis of ozone and water, will be added on parent PAHs, followed by reaction with nitrogen dioxide NO_2 and the loss of H_2O , at nighttime, process occurs by the addition of nitrate radicals, followed by reaction with NO_2 and elimination of nitric acid. Figure 4 shows an example of N-PAH formation during daytime and nighttime, from primary PAH molecules: fluoranthene and B[a]P. 2-nitrofluoranthene and 2-nitropyrene are formed by the reaction of fluoranthene and pyrene with OH radicals and NO_x , while 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene are produced and emitted during combustions processes and are therefore found in diesel exhausts (Reisen *et al.* 2005). If the 2-nitrofluoranthene/1-nitropyrene ratio is less than 5, it indicates that combustion sources are dominant, while a ratio greater than 5 indicates photochemical transformation of PAHs is dominant

1 (Bandowe *et al.* 2017). Many studies have demonstrated the formation of N-PAHs from particles bound-
2
3 PAHs (Keyte *et al.* 2013). PAHs can be bound to real atmospheric particulate matter or model particles
4
5 (Keyte *et al.* 2013; Jariyaposit *et al.* 2014; Zimmermann *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2011; Carrara *et al.*
6
7 2010; Cazaunau *et al.* 2010.). Mineral dusts can also promote the formation of N-PAHs (Kameda *et al.*
8
9 2016). O-PAHs are organic compounds containing one or more carbonyl oxygen attached to the aromatic
10
11 ring structure. They are byproducts of combustion or the result of photo-oxidation and atmospheric
12
13 oxidation of parent PAHs (Kojima *et al.* 2010 a). Compared to parent PAHs, O-PAHs are characterized
14
15 with lower vapor pressures, and subsequently, have a higher tendency to stay in the particulate phase
16
17 (Ren *et al.* 2017). Like N-PAHs, the formation of O-PAHs occurs through different processes. They are
18
19 formed (i) directly from the incomplete combustion of organic matter (Oda *et al.* 2001; Jakober *et al.*
20
21 2007), (ii) by photo-chemical reaction with atmospheric oxidants including ozone (O₃), nitrogen oxides
22
23 (NO_x), and hydroxyl radicals (Albinet *et al.* 2008 a; Bandowe *et al.* 2014 a; Eiguren-Fernandez *et al.*
24
25 2008; Wang *et al.* 2011) or (iii) by photo-degradation of their parent PAHs. O-PAHs are frequently
26
27 formed during incomplete combustion, particularly when 5-20% of excess air is supplied at high
28
29 temperature (800-2000 °C). A positive correlation has been observed between humidity and temperature
30
31 on the one hand and O-PAHs formation on the other hand (Lee *et al.* 2017). In addition, under the action
32
33 of light and atmospheric oxidants, O-PAHs can be formed after N-PAHs degradation under the action of
34
35 light and atmospheric oxidants. Some studies have suggested that O-PAHs are more reactive towards
36
37 oxidants than N-PAHs, indicating that nitration of O-PAHs may be the potential source of N-PAHs (Miet
38
39 *et al.* 2009 b). O-PAHs may be found in gas phase or may be adsorbed onto particles. Oxygenated
40
41 derivatives are mostly found in diesel exhaust particles or particulate matter from both urban and rural
42
43 sites, especially those influenced by vehicular emissions (Layshock *et al.* 2010; Burtscher *et al.* 2012;
44
45 Albinet *et al.* 2008). The sulfur content of petroleum fuels contributes to the formation of sulfur dioxide
46
47 (SO₂), which causes both acid deposition and poisoning of the catalytic converters in vehicles (Liang *et al.*
48
49 *et al.* 2006). One of the main forms of organic sulfur compounds in heavy fuel oil is the thiophene moiety
50
51 where sulfur is incorporated into PAHs to form sulfur heterocycles (PASHs or Thia-PAHs). PASHs have
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 been applied as important molecular markers in geochemistry and petroleum exploration. It was reported
2
3 that some PASHs can be potential indicators of the origin and maturity of crude oils (Hegazi *et al.* 2003).
4
5 Benzothiophene, dibenzothiophene, benzonaphthothiophenes and their alkylated homologues are the most
6
7 abundant organosulfur compounds in diesel fuels.
8
9

10 Reactions between gaseous PAHs and hydroxyl radicals can result to the formation of OH-PAHs,
11
12 with one or more OH-groups attached. Like PAHs and others PAHs derivatives, OH-PAHs can be formed
13
14 directly from incomplete combustion processes and also by microbiological and/or photochemical
15
16 degradation of parent's PAHs. Biomass, wood and coal combustion have been identified as primary
17
18 sources of OH-PAHs (Simoneit *et al.* 2007; Bi *et al.* 2008; Avagyan *et al.* 2016; Vione *et al.* 2004). OH-
19
20 PAHs are characterized by low volatility explaining why OH-PAHs tend to be associated with the
21
22 particulate phase. Several studies in the literature have detected OH-PAHs, in both PM₁₀ and PM_{2.5}
23
24 collected in semi-urban areas (Vione *et al.* 2004; Kishikawa *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007; Barrado *et al.*
25
26 2012; Barrado *et al.* 2012; Barrado *et al.* 2013) or in wood smoke particles (Cochran *et al.* 2013; Avagyan
27
28 *et al.* 2016). Some studies have investigated the formation mechanisms of OH-PAHs during combustion,
29
30 and have suggested three possible mechanisms of formation, (i) through a singlet oxygen mediated
31
32 pathway, (ii) through rapid radical reaction or (iii) pyrolysis of kerogen in coal which contains many
33
34 hydroxyl groups. The addition of hydrocarbon radicals to lower molecular weight PAHs can lead to the
35
36 formation of higher alkylated OH-PAHs. Ratios between PAHs and corresponding OH-PAHs were used
37
38 to identify the coal maturity or types (Bi *et al.* 2008).
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **3. PAHs derivatives in atmosphere**

51
52 During the last decades, PAHs derivatives in atmosphere have been intensively studied especially
53
54 in particulate matter. Table 4 and table 5 showed N-PAHs and O-PAHs concentrations in particulate
55
56 (TSP, PM₁₀, PM_{2.5}, PM_{0.3}) or gas phases, from 1995 to 2017, in cities atmosphere worldwide. Some
57
58 studies have demonstrated that N-PAHs and O-PAHs concentrations are higher in winter than in summer
59
60 (Ren *et al.* 2017; Albinet *et al.* 2008; Bamford *et al.* 2003; Teixeira *et al.* 2011; Wang *et al.* 2014;
61
62
63
64
65

1 Chuesaard *et al.* 2014). Primary and/or secondary origins of O-PAHs and N-PAHs were strongly
2
3 dependent on the sampling site and on sampling conditions (Ringuet *et al.* 2012). Bandow *et al.* suggested
4
5 that concentrations of both- Σ -O-PAHs and Σ -N-PAHs were higher in winter than in summer due to the
6
7 contribution of primary emissions (i.e. household heating) and also the favorable effects of winter
8
9 ambient conditions on the enrichment of these compounds in particles (Bandowe *et al.* 2014). Walgraeve
10
11 *et al.* has observed a clear seasonal effect on O-PAHs concentrations with a factor of 3-4 between winter
12
13 and summer values (Walgraeve *et al.* 2010). Albinet *et al.* suggested that gasoline engines were an
14
15 important source of N-PAHs and O-PAHs. The dominant source of 1-nitropyrene, 2-nitrofluorene, 6-
16
17 nitrochrysene and benz[*a*]anthracene-7,12-dione appeared to be diesel vehicles while 9,10-anthraquinone
18
19 presented a double origin (primary diesel emission and photochemical processes) and was only detected
20
21 at the rural site (Albinet *et al.* 2007). A study realized in three European cities (Oporto – traffic site,
22
23 Florence – urban background, Athens – suburban) showed that the most abundant O-PAHs in all cities
24
25 was 1,8-naphthalic anhydride, whereas 5-nitroacenaphthene was the most encountered N-PAH. The Σ -O-
26
27 PAHs/ Σ -PAHs and Σ -N-PAHs/ Σ -PAHs ratios were higher in summer than in winter, suggesting
28
29 increasing formation of derivatives by photochemical degradation of PAHs (Alves *et al.* 2017). Among
30
31 12 O-PAHs found in PM₁₀, collected in Santiago de Chile city at Chili, 1-Pyrenecarboxaldehyde showed
32
33 the highest concentration during winter and spring (Sienra 2006). In a one year study (2013-2014), sixty
34
35 O- and N-PAHs were measured in Grenoble-Les Frênes. Results showed that residential heating (*i.e.*
36
37 biomass burning) controls O- and N-PAHs concentrations. 6H-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one, biphenyl-2,2'-
38
39 dicarboxaldehyde and 3-nitrophenanthrene have also been identified as probably good marker candidates
40
41 of PAHs oxidation processes in ambient air (Tomaz *et al.* 2017). Garçia *et al.* (2014) have demonstrated,
42
43 after studying diagnostic ratios of N-PAHs in the Porto Alegre atmosphere (Brazil), that heavy diesel
44
45 vehicles were one of the major contributors of atmospheric N-PAHs (Garcia *et al.* 2014). In Braga
46
47 (Portugal), 5-nitroacenaphthene was the only detected N-PAHs while indanone and 1,8-naphthalic
48
49 anhydride were the most abundant O-PAHs, accounting for 25 and 17% respectively of the total
50
51 concentrations of this organic class. Other abundant O-PAHs (1,4-naphthoquinone, 9-fluorenone, 1,2-
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 acenaphthylenequinone and 7H-benz[de]anthracene-7-one) can also be detected (Alves *et al.* 2016). A
2
3 study performed in China indicates that O-PAHs concentrations in fine particles have significantly
4
5 decreased between 2003 and 2013 especially in winter. It was mainly related to the decrease in domestic
6
7 coal consumption replaced by natural gas or petroleum (Ren *et al.* 2017). In another study in China, the
8
9 monitoring O-PAHs and N-PAHs in PM_{2.5} in a middle-school classroom in Xi'an city has showed that O-
10
11 PAHs and N-PAHs averages were 19.1 and 16.4 ng/m³, 0.1039 and 0.0785 ng/m³ for outdoor and indoor
12
13 air, respectively. Biomass burning, coal combustion, and motor vehicle emissions were the main sources
14
15 for PAHs, but, secondary particles formation was also important for the O-PAHs and N-PAHs (Wang *et*
16
17 *al.* 2017). PM_{2.5}-bounded N- and O-PAHs were analyzed at two industrial sites in southern China; their
18
19 concentrations were approximately 2–3 orders of magnitude lower than that of parent PAHs. Despite of
20
21 most N-PAHs and O-PAHs showed notable seasonal variations, no significant diurnal variation was
22
23 observed (Wei *et al.* 2012). Lee *et al.* (2017) showed that the average concentration of seven O-PAHs
24
25 was around 7.6 ± 4.3 ng/m³, with distinctive seasonal variations, being higher in winter (8.70 ± 3.90
26
27 ng/m³) than in summer (1.47 ± 0.73 ng/m³) in particulate matter collected in Korea. Mixed contributions
28
29 of primary emissions (*i.e.* vehicular emissions, biomass burning, long-range transport) and atmospheric
30
31 reactions to O-PAHs production have been identified. They showed also that primary emissions might
32
33 affect the O-PAHs levels more than atmospheric reactions (Lee *et al.* 2017). Albinet *et al.* in 2008,
34
35 showed that N-PAHs and O-PAHs in PM₁₀, in two French alpine valleys, presented large variations in
36
37 concentrations between winter and summer, and between traffic, suburban and rural sites, and that N-
38
39 PAHs and O-PAHs concentrations were hugely depending on their vapor pressure. In the same study,
40
41 they investigated the 2-nitrofluoranthene/1-nitropyrene ratio and they showed that N-PAHs gas phase
42
43 formation was hindered in winter and when relative contribution from primary sources was higher. This
44
45 ratio also indicates that, for all sampling sites, the day-time OH initiated reaction seemed to be the
46
47 dominant gas phase formation pathway over the NO₃ initiated reaction, this latter being predominant
48
49 during the night (Albinet *et al.* 2008 a; Albinet *et al.* 2008). Wang *et al.* (2011) reported that 2-
50
51 nitropyrene and 2- nitrofluoranthene are generated in the atmosphere and not emitted directly in this form
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 (Wang *et al.* 2011). N-PAHs presented different diurnal and nocturnal profiles. They also showed that
2
3 photolysis reactions were the main mechanism to remove N-PAHs from atmosphere. Souza *et al.* (2014)
4
5 showed a strong correlation between particulate N-PAHs and PAHs in a subtropical rural region in São
6
7 Paulo State (Brazil) and concluded on similar emission sources. In the same work, O-PAHs presented
8
9 distinct diurnal and nocturnal profiles. For example, benzantrone, a primary pollutant, was mainly found
10
11 in the nocturnal samples, while 9,10-anthraquinone and 9-fluorenone, which can be directly emitted,
12
13 showed no predominance in any period of the day. No correlation between O-PAHs and PAHs
14
15 compounds was observed at night, which suggests the existence of independent sources for these two
16
17 compound classes (Souza *et al.* 2014). In the study of Hien *et al.* (2007), two N-PAHs, 1-nitropyrene and
18
19 2-nitrofluoranthene were quantified in PM collected at three ambient air sites in Vietnam, and the
20
21 daytime/nighttime distribution of 2-nitrofluoranthene as well as the 2-nitrofluoranthene/1-nitropyrene
22
23 ratio were used to evaluate the gas-phase formation of 2-nitrofluoranthene and its formation route. This
24
25 study suggested that the gas-phase reactions were an important source of 2-nitrofluoranthene in the
26
27 ambient air and indicated that an NO₃ radical-initiated reaction is the dominant route for 2-
28
29 nitrofluoranthene formation. The majority of 2-nitrofluoranthene detected at the traffic site may be
30
31 attributed to OH radical-initiated reactions (Hiena *et al.* 2007). An investigation on PM_{2.5} in Madrid
32
33 showed that concentrations of two OH-PAHs, 2-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene, were
34
35 ranging from 12 to 200 pg/m³ and 3 to 60 pg/m³ respectively. Concentrations were clearly dependent of
36
37 the season, increasing in the colder months and decreasing in the warmer months. Variations in
38
39 concentrations were directly related to (i) levels of phenanthrene and pyrene, (ii) weather conditions, and
40
41 (iii) presence of other chemical pollutants in atmosphere such as nitrogen and sulphur oxides. An inverse
42
43 relationship with temperature, ozone concentration, solar radiation, and UV radiations intensity has been
44
45 observed (Barrado *et al.* 2012). Studies involving the concentrations of PASHs in PM are very limited. A
46
47 study of organosulfur compounds in Diesel particulate matter extracts and the corresponding fuels has
48
49 been realized in 2006. In the tested fuels, a larger proportion of PASHs with one or two rings were
50
51 identified and trimethylbenzothiophenes, dibenzothiophenes, and 4-methyldibenzothiophene were the
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 most abundant sulfur compounds. PASHs compounds, with higher molecular weight, were more
2
3 abundant in Diesel particulate matter extracts where the concentrations of total organic sulfur and
4
5 individual PASHs are higher for the high-sulfur diesel fuel (Liang *et al.* 2006).
6

7 **4. Analysis of PAH derivatives in airborne particles**

8
9
10 Many studies have developed comprehensive procedures of quantitative and qualitative analyses
11
12 of PAH and their derivatives in particles and biological samples. Despite the molecular structure
13
14 differences between all PAH derivatives, analytical procedures are quite similar and only some
15
16 differences in samples preparation occur. Different analytical techniques, with high resolution and
17
18 specificity have been developed for the determination of PAHs derivatives. Gas Chromatography (GC) is
19
20 widely used, due to the high resolution, sensitive and selective detection. Many types of detectors have
21
22 been developed for N-, O- and OH-PAHs (*i.e.* Electron Capture Detector (ECD), Nitrogen and
23
24 Phosphorus selective Detector (NPD), Thermionic Ionization Detector (TID) operated in a nitrogen
25
26 atmosphere, ChemiLuminescence Detector (CLD) and Mass Spectrometry (MS)) (Liu *et al.* 2007). For
27
28 N- and O-PAHs, for which lowest detection limits are required, Ion Chemical Ionization Mass
29
30 Spectrometry (NCI-MS), ECD, and GC×GC- Nitrogen Chemiluminescence Detector (NCD) are the most
31
32 widely used techniques (Bezabeh *et al.* 2003; Dusek *et al.* 2002; Siegmund *et al.* 2003; Farren *et al.*
33
34 2015). Concentrations of N-, O- and OH-PAHs in the airborne particle are very low and pretreatment of
35
36 samples is necessary and constitutes a very important step for their determination. To extract PAHs
37
38 derivatives, different extraction solvents (e.g., dichloromethane, acetonitrile, benzene, toluene,
39
40 cyclohexane and their mixture) can be used. Mostly applied extraction methods used for PAH samples are
41
42 extraction using solvents (Soxhlet Extraction (SE), Ultrasonic Extraction (UE), Supercritical Fluid
43
44 Extraction (SFE), Microwave Assisted Extraction (MAE), Accelerated/Pressurized Solvent Extraction
45
46 (APSE)), rotary evaporator concentration and clean-up with columns (Lee *et al.* 2001; Bae *et al.* 2002;
47
48 Zhang *et al.* 2005; Chetwittayachan *et al.* 2002; Hafner *et al.* 2005). Protocols used in different studies on
49
50 PAH derivatives in airborne particulate are summarized in table 6. In 2003, Supercritical Fluid Extraction
51
52 (SFE) method, with 2 steps, was applied for the analysis of N- and O-PAHs in urban aerosol samples as
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 an alternative to conventional extraction techniques such as Soxhlet or sonication. The first step, using
2
3 CO₂, allowed removing the less polar compounds from the matrix and the second one, using toluene-
4
5 modified CO₂, allowed extracting N- and O-PAHs without need for purification. Extracts were analyzed
6
7 using Gas Chromatography with Electron-Capture Detection and coupled to mass spectrometry (Castells
8
9 *et al.* 2003). In 2000, Jinhui *et al.* have developed derivatization-GC/ECD analytical method based first
10
11 on the reduction of N-PAHs to their corresponding Amino-PAHs by NaBH₄, and then followed by
12
13 derivatization of the Amino-PAHs with HeptaFluoroButyric Anhydride (HFBA) (Jinhua *et al.* 2000). In
14
15 2014, Albinet *et al.* have developed an extraction procedure based on the Quick Easy Cheap Effective
16
17 Rugged and Safe (QuEChERS) approach and used for analysis of particle-bound nitrated and oxygenated
18
19 PAH derivatives (Albinet *et al.* 2014). In 2016, Albinet *et al.* have developed another analytical method,
20
21 easy to apply, for the simultaneous determination of 17 N-PAHs and 9 O-PAHs at very low concentration
22
23 levels. This method allowed a routine quantification of ambient air N-PAHs and O-PAHs within a single
24
25 analysis. This analytical procedure was applied to both gas and particulate samples collected in the Alpine
26
27 Valley during the French POVA program (Pollution des Vallées Alpines) (Albinet *et al.* 2007). Briefly,
28
29 filters and PolyUrethane foams (PUF) were extracted with dichloromethane using Accelerated Solvent
30
31 Extraction and the Dionex ASE 200 and ASE 300 systems, respectively. After extraction, extracts were
32
33 evaporated under a nitrogen stream and adjusted with dichloromethane. After, two reversed phase
34
35 columns, connected in series, were used in order to have a better separation of PAHs. N-PAHs and O-
36
37 PAHs concentrations were determined simultaneously using Gas Chromatography-Mass Spectrometry
38
39 with Negative Ion Chemical Ionisation (GC-MS/NICI) and Selective Ion Monitoring mode (SIM)
40
41 (Albinet *et al.* 2007). Individual N-PAHs and O-PAHs detection limits in a typical air sample of 360 m³
42
43 ranged between 0.01 and 0.07 pg/m³ and 0.01 and 2.6 pg/m³, respectively (Albinet *et al.* 2008 a). Another
44
45 work in 2003, quantify 28 N-PAHs compounds in diesel and air particulate SRMs. N-PAHs were
46
47 extracted using Pressurized-Fluid Extraction (PFE) with dichloromethane and were analyzed GC-
48
49 MS/NICI. Liquid chromatography separation steps, was used in this case to remove other polar organic
50
51 constituents in samples that can interfere with the determination of some N-PAHs, especially at low
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 concentration levels. In order to extract N-PAHs, another original method without organic solvent was
2
3 used by Barrado *et al.* 2013 (Barrado *et al.* 2013). They used pressurized Microwave-Assisted Extraction
4
5 (MAE), a new extraction technique that combines microwave and traditional solvent extraction. Using
6
7 such technique has the advantages to increase the kinetics of extraction, and include shorter extraction
8
9 times, higher extraction rates, lower costs, and less solvent use (Beoletto *et al.* 2016). N-PAHs and O-
10
11 PAHs can be analyzed without derivatization, hydroxyl groups in OHs-PAHs need to be inactivated
12
13 before GC-MS analysis but derivatization is not necessary when the LC-MS method can be applied. To
14
15 analysis OH-PAHs, extraction from PM_{2.5} is done by low-temperature ultra-sonication in closed
16
17 containers with methanol. After evaporation with a stream of nitrogen, extracts were suspended in 1 mL
18
19 of methanol and directly injected into the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). OH-PAHs
20
21 levels have been determined by liquid chromatography (Barrado *et al.* 2012; Barrado *et al.* 2013). In
22
23 order to ensure that no loss occurs during the extraction and preparation procedure, samples were spiked
24
25 with appropriate amounts of recovery standards (deuterated 9-nitroanthracene-d₉, 6-nitrochrysene-d₁₁).
26
27 After dichloromethane extraction, a purification step is done on silica gel/Al₂O₃ column. This step is very
28
29 important to remove macromolecules and polar interfering compounds. Eluate of hexane:
30
31 dichloromethane (1:1) solution was collected and further applied on a HPLC for a second purification to
32
33 separate PAHs fraction from the derivative PAHs (Wang *et al.* 2014; Wei *et al.* 2012). O'Connell *et al.*
34
35 (2013) developed two independent approaches for separation and quantification of 24 OPAHs, using
36
37 Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry (LC-APCI/MS)
38
39 and Gas Chromatography-Electron Impact/Mass Spectrometry (GC-EI/MS). In this study, the GC-MS
40
41 method was preferred to LC-MS (O'Connell *et al.* 2013). Concerning PASHs, an analytical method for
42
43 the determination of Tetra-, Penta- and Hexacyclic PASHs in aluminum melting facility has been applied
44
45 in 1998 by Becker *et al.* Particles collected on glass fiber filters and polyurethane foams were extracted
46
47 by Soxhlet for 15 h in 50 mL of dichloromethane. After extraction, internal standard was added and
48
49 samples were analyzed by GC-AED (Becker *et al.* 1998). Liang *et al.* (2006), have used GC-MS with
50
51 Atomic Emission Detection (AED) to determine organosulfur compounds in DPM extracts. Before
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 extraction, filters were spiked with deuterated internal standards, and then extracted in dichloromethane
2
3 with sonication followed by filtration to remove the insoluble fraction (Liang *et al.* 2006)
4
5
6
7

8 **5. Toxicological effects of PAHs and their derivatives**

9 ***5.1. Toxicity of PAHs***

10
11
12
13 PAHs are one of the most important atmospheric pollutants of human health concern, owing to
14
15 their high carcinogenic potential and the ubiquity of their sources (Wang *et al.* 2013). PAHs are absorbed
16
17 through ingestion, inhalation and dermal contact, and general population are exposed to PAHs by
18
19 breathing ambient air (indoor and outdoor), smoking cigarettes, fireplaces, and eating food contaminated
20
21 with PAHs. After absorption, PAHs are rapidly and widely distributed in the organism, enter the lymph,
22
23 circulate in the blood and are metabolized primarily in the liver. Because of their lipophilic nature, PAHs
24
25 can accumulate in breast milk and adipose tissues and can easily cross cell membranes through passive
26
27 diffusion after absorption. Acute effects of PAHs on human health depend on several factors: exposure
28
29 extent, PAHs concentrations during exposure, exposure route, health conditions and age. Occupational
30
31 exposure to high levels of pollutant mixtures containing PAHs are known to create symptoms such as eye
32
33 irritation, nausea, vomiting, diarrhea, skin irritation and inflammation (Unwin *et al.* 2006). Some studies
34
35 have demonstrated a series of health problems such as skin and lung bladder, and gastrointestinal cancers
36
37 in workers exposed to PAHs mixtures (Bach *et al.* 2003; Diggs *et al.* 2011; Olsson *et al.* 2010).
38
39 Metabolites of some PAHs have become the major health concerns because their ability to bind to cellular
40
41 proteins and DNA with toxic effects, and cell damage can lead to mutations, developmental
42
43 malformations, tumors, and cancer (Armstrong *et al.* 2004; Bach *et al.* 2003). Biotransformation of PAHs
44
45 involves multiple metabolic enzymes and 3 known major pathways: (i) CYP1A1/1B1 and epoxide
46
47 hydrolase pathway, (ii) CYP peroxidase pathway, and (iii) aldo-keto reductases pathway (AKR pathway).
48
49 PAHs are metabolized by CYPs and other metabolic enzymes into phenols, catechols and quinones,
50
51 resulting in the formation of diol- epoxides, radical cations, or reactive and redox-active o-quinone
52
53 (Moorthy *et al.* 2015). Cytochrome P450 family, being under transcriptional control of the Aryl
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 hydrocarbon Receptor (AhR), which is also a transcriptional regulator of a number of phases II enzymes
2
3 (Nebert *et al.* 2006; Shimada *et al.* 2004). Figure 6 describes the activation of the well-known PAHs
4
5 model, the B[a]P, by CYP genes. AhR resides in the cytosol, bound to chaperone proteins HSP90. Upon
6
7 PAHs binding, AhR migrates to nucleus, where AhR dissociates from chaperone proteins and
8
9 heterodimerizes with ARNT, in order to activate transcription of CYP genes, after fixation on Xenobiotic
10
11 Element Response (XRE). After transcription, mRNA is translocated into cytoplasm and translation by
12
13 ribosomes, give neosynthesized CYP protein ready to metabolize PAHs. Hydroxylated metabolites of
14
15 PAHs are excreted in human urine both as free hydroxylated metabolites and as hydroxylated metabolites
16
17 conjugated to glucuronic acid and sulfate. In several studies, 1-hydroxypyrene, a metabolite of pyrene,
18
19 has been widely used as urinary biomarker of PAH exposure (Jongeneelen *et al.* 2001; McClean *et al.*
20
21 2004; Sobus *et al.* 2009; Stroomberg *et al.* 2003). In 2010, the International Agency for Research on
22
23 Cancer (IARC) has listed the following PAHs as human carcinogens or potential carcinogens: B[a]P,
24
25 benz[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, dibenz[a,h]anthracene, 7H-
26
27 dibenzo[c,g]carbazole, dibenzo[a,h]pyrene, dibenzo[a,i]pyrene, indeno[1,2,3cd]pyrene,
28
29 benzo[k]fluoranthene, dibenzo[a,e]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene and 5-methylchrysene (Bach *et al.* 2003).
30
31 PAHs carcinogenicity often occur after their activation by xenobiotic-metabolizing enzymes to highly
32
33 reactive metabolites capable of altering cellular DNA (Shimada *et al.* 2004). Tumor initiation of PAHs
34
35 has been involved by two major mechanisms: one-electron oxidation to produce radical cations and
36
37 mono-oxygenation to form bay-region diol epoxides. This pathway was extensively investigated in rat
38
39 liver microsomes or reconstituted systems containing purified rat CYP and epoxide hydrolase. Figure 5
40
41 describes the metabolic activation of B[a]P to bay region epoxides by P450 and epoxide hydrolase
42
43 (Shimada *et al.* 2004; Jankowiak *et al.* 2004). B[a]P, the first chemical carcinogen to be discovered, is
44
45 activated to B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), which reacts with DNA predominantly at the N²-
46
47 position of guanine to produce primarily N²-guanine lesions, such as BPDE-N²-deoxyGuanosine (BPDE-
48
49 N²-dG) adduct (Alexandrov *et al.* 2010). Leclercq *et al.* in 2016, have studied the capacity of Normal
50
51 Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)-NHBE
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 cells to metabolize some PAHs coated on PM₄. Xenobiotic-Metabolizing Enzyme (XME) gene
2
3 expression and the determination of some B[a]P metabolites and OH-B[a]P DNA adducts have been
4
5 evaluated. Results have shown increases in oxidative damage and cytokine secretion in exposed NHBE
6
7 cells and particularly in COPD-DHBE cells. Diseased cells exposed had lower capacities to metabolize
8
9 the organic chemicals-coated onto the air-pollution-derived PM₄, such as B[a]P, but showed higher
10
11 sensibility to the formation of OH-B[a]P DNA adducts, because their diseased state possibly affected
12
13 their defense capacities (Leclercq *et al.* 2016). Referring to occupational exposure of workers to PAHs,
14
15 several studies have demonstrated association between human exposure to PAHs and carcinogenicity
16
17 (Zhang *et al.* 2009; Bach *et al.* 2003; Armstrong *et al.* 2004; Boffetta *et al.* 1997; Boers *et al.* 2005; Clapp
18
19 *et al.* 2008; Travares *et al.* 2004). *In-vivo* studies, have shown that exposure to certain levels of some
20
21 PAHs induced lung cancer from inhalation, stomach cancer from ingesting PAHs in food, and skin cancer
22
23 from skin contact (Hecht 1999; Latif *et al.* 2010; Lynch *et al.* 2013). Another animal studies have shown
24
25 that some PAHs can also affect the hematopoietic and immune systems producing reproductive,
26
27 neurologic, and developmental adverse effects (Latif *et al.* 2010; Jong *et al.* 1999). During PAHs
28
29 metabolism, reactive intermediates, that can form adducts, have been demonstrated to result in a spectrum
30
31 of cellular mutations that may be teratogenic (Wells *et al.* 2010). Embryotoxic effects of PAHs have been
32
33 described in many studies. In 2005, Perera *et al.*, from US's center for children's environmental health,
34
35 have demonstrated that exposure to PAHs pollution during pregnancy was related to adverse birth
36
37 outcomes (birth weight, premature delivery, and delayed child development) (Perera *et al.* 2005). It has
38
39 also been demonstrated by several studies that exposure to PAHs can be associated with low IQ at age of
40
41 three, increased behavioral problems at ages six to eight, and childhood asthma (Edwards *et al.* 2010;
42
43 Perera *et al.* 2011). In 2011, Ren *et al.* have investigated placental PAHs levels in 80 fetuses or newborns
44
45 with neural tube defects in China, and showed that the risk of a defect was 4 to 5 times greater when the
46
47 levels of PAHs were above the average of 597 ng/g of lipids (Ren *et al.* 2011). An association between
48
49 the low levels of placental PAH-DNA adducts with an increased risk of neural tube defects was reported
50
51 by Yuan *et al.* (Yuan *et al.* 2013). Table 7 shows some data from *in-vitro*, *in-vivo* or epidemiological
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 studies related to PAHs exposure.
2

3 Many studies have paid attention to oxidized form of PAHs, especially N-PAHs, O-PAHs, OH-
4 PAHs and PASHs. Toxicokinetics of PAHs derivatives are similar to those of parent's PAHs. With
5
6 PAHs and PASHs. Toxicokinetics of PAHs derivatives are similar to those of parent's PAHs. With
7
8 respect to their human health effects, PAHs derivatives are considered to be more toxic than their parent
9
10 PAHs because of their direct mutagenic potency, whereas PAHs require first an enzymatic activation (Yu
11
12 2002).
13
14

15 16 17 18 **5.2. Toxicity of N-PAHs** 19

20 Studies on toxicological effects of N-PAHs have been started a long time ago, and it has been
21
22 several times proved that they are much more toxic than the parent PAHs (Châtel *et al.* 2014). For
23
24 example, 1,8-dinitropyrene, appeared to be three times more mutagenic than B[a]P which is considered as
25
26 one of the most toxic PAHs (Tokiwa *et al.* 1986). In 1994, Peter *et al.* studied the toxic effect of 1-nitro-
27
28 B[a]P and 3-nitroB[a]P derived from B[a]P and showed that these two derivatives were direct mutagenic,
29
30 while 6-nitro-B[a]P was requiring metabolic activation to exert its genotoxic effect (Fu *et al.* 1994). After
31
32 absorption, N-PAHs may be metabolized by nitro-reduction, and conjugation reactions leading to reactive
33
34 metabolites that can covalently bind to macromolecules including DNA. Biotransformation of N-PAHs
35
36 can be done by different pathways. For the first one, responsible enzymes are CYP enzymes and/or CYP
37
38 reductases that lead to the formation of N-hydroxylamine and the corresponding amine forms (Chae *et al.*
39
40 1999). The second one is more important and includes six electron reduction reactions catalyzed by
41
42 nitroreductases like nitric oxide synthase (NOS), DT-diaphorase, xanthine oxidase and aldehyde oxidase
43
44 (Pluquet *et al.* 2001; Purohit *et al.* 2000). In Human, 1-nitropyrene is metabolized through hydroxylation,
45
46 nitro-reduction and N-acetylation pathways. The major metabolites correspond to hydroxy-1-nitropyrene,
47
48 3-, 6, and 8-hydroxy-1-nitropyrene their N-acetylamino derivatives, N-acetyl-1-aminopyrene, and 1-
49
50 aminopyrene (Toriba *et al.* 2007). Studies on 1-nitropyrene metabolism was started by Dutcher *et al.*
51
52 1986: metabolism and excretion of 1-nitropyrene, on Fischer-344 rats after intraperitoneal or oral
53
54 administration was studied and results showed that reduction of the nitro group was significant route of 1-
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 nitropyrene metabolism in rats and that activation of N-PAHs to carcinogens or toxins by nitro-reduction
2
3 was possible (Dutcher *et al.* 1985). Nebert *et al.* (2004) have revealed that N-PAHs metabolizing
4
5 enzymes are induced by the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), known to be activated by many aromatic
6
7 compounds (Nebert *et al.* 2004). Based on several scientific studies, IARC working group on the
8
9 Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans has classified several N-PAHs into carcinogenic groups
10
11 (Bandowe *et al.* 2017). Several studies have shown that N-PAHs are toxics, both, *in-vitro* and *in-vivo* and
12
13 possess mutagenic and carcinogenic properties which are generally more dangerous than those of the
14
15 frequently monitored PAHs. Regarding toxicological effects of N-PAHs, some results obtained from the
16
17 bibliography are presented in the Table 8. Mutagenicity of N-PAHs, notably of mono-nitrofluoranthenes,
18
19 evidenced by Ames test was first reported by Tokiwa *et al.* (1981) and Pederson *et al.* (1981) (Tokiwa *et*
20
21 *al.* 1981a; Pederson *et al.* 1981; Tokiwa *et al.* 1986). Since 1985, studying carcinogenicity of N-PAHs in
22
23 animal models show interesting results (Beland *et al.* 1985; Fu *et al.* 1988). In 1989, Djuric *et al.*
24
25 observed in rat's laboratory animals that 1,6 dinitropyrene can damage DNA by two different pathways
26
27 under aerobic conditions and this may contribute to its potent tumorigenicity (Djuric *et al.* 1989). In 1994,
28
29 West *et al.* suggested that mutagenicity and carcinogenicity of N-PAHs are associated with the structure
30
31 of the PAHs and the position of the nitro group. After exposure of RTE cells, to a series of N-PAHs,
32
33 effective preneoplastic transformation induction was observed in a structure dependent manner.
34
35 Furthermore, many other studies have shown that structure-dependent metabolism is responsible for the
36
37 production of reactive and genotoxic products (Wislocki *et al.* 1986; West *et al.* 1994). Fu *et al.* suggested
38
39 in 1994 that orientation of nitro group can play a major role in carcinogenicity. For example, when nitro-
40
41 group adopts a perpendicular or nearly perpendicular orientation, carcinogenic property of these N-PAHs
42
43 is weaker than the parent PAHs (Fu *et al.* 1994). Several studies have found that 1-nitropyrene was highly
44
45 mutagenic and that mammalian cells and mammary tumors were induced in rats treated with 1-
46
47 nitropyrene (Varga *et al.* 2006; Watt *et al.* 2007; Imaida *et al.* 1995). A recent study performed in 2017
48
49 assesses whether environmental 1-nitropyrene concentration was able to induce genotoxicity and
50
51 oxidative damages in *Tilapia O. Niloticus*. Results showed that 1-nitropyrene concentration induced
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 genotoxicity and oxidative stress. Another study in *Pleuronectes yokohamae* fed with 7 N-PAHs showed
2
3 MicroNuclei (MN) and other Nuclear Abnormalities (NA) formation in erythrocytes (Bacolod *et al.*
4
5 2013). 1-nitronaphthalene, 1,5-dinitronaphthalene, 2-nitrofluorene and 9-nitroanthracene were found to
6
7 induce genetic toxicity, causing increased incidence of Homologous Recombination (HR) that can be a
8
9 major mechanism in the Loss Of Heterozygosity (LOH) (Dihl *et al.* 2008). Murine embryonic carcinoma
10
11 cell line P19 (wild type or transfected with luciferase reporter pRARE 2-TK-luc plasmid (P19/A15
12
13 clone)) exposed to 1,7-phenanthroline, showed significantly down-regulation in Octamer-4 (Oct-4) and
14
15 inhibition of All-Trans Retinoic Acid ATRA-mediated response, implicated in embryonic development
16
17 (Benisek *et al.* 2011; Benisek *et al.* 2008). BEAS-2B and A549 cells exposed to 1-nitropyrene exhibited
18
19 enhanced pro-inflammatory gene expression and excessive 8-OHdG and reactive oxygen species (Kim *et*
20
21 *al.* 2005; Park *et al.* 2009). Oxidative stress is one of the major physiopathological signaling pathways for
22
23 the effect of nitro-PAHs exposures. 8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) is a well-known biomarker
24
25 of oxidative DNA damage (Ren *et al.* 2010; Wei *et al.* 2009; Neophytou *et al.* 2013) and Neophytou *et al.*
26
27 (2014) have shown a positive correlation between the exposure level of two N-PAHs, 1-aminonaphthalene
28
29 and 2-aminonaphthalene, with 8-OHdG formation, indicating the presence of an oxidative stress due to
30
31 these nitro-compounds (Neophytou *et al.* 2013). Oya *et al.* investigated the exposure of the human
32
33 epithelial BEAS-2B cells to two nitro-compounds: 2-nitrobenzothrone and 3-nitrobenzothrone and
34
35 showed that 3-nitrobenzothrone was the most potent compound. It induced apoptosis of cells and
36
37 accumulation in S-phase due to phosphorylation of Ataxia–Telangiectasia Mutated (ATM), checkpoint
38
39 kinase Chk2/Chk1, H2AX and p53 (Oya *et al.* 2011). In order to reveal the environmental health hazards
40
41 of particulate 1-NP, male Wistar rats have been exposed to 1-nitropyrene, and results showed significant
42
43 increase of lung DNA damage accompanied by decreasing DNA repair capacity, and promoting oxidative
44
45 stress and metabolic enzyme activation, the whole contributing to lung genotoxicity (Lia *et al.* 2017).
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 N-PAHs are secondary pollutants, detected in many environmental samples including particulate
58
59 matter and Diesel Exhaust Particles and have potential respiratory health risks. Many studies have
60
61 suggested that the development of lung cancer could be related to the concentrations of N-PAHs in
62
63
64
65

1 particles (Garshick *et al.* 2004; Pope III *et al.* 2002; Vineis *et al.* 2004). In 2011, Traversi *et al.* showed
2
3 the involvement of N-PAHs in the mutagenicity of urban PM_{2.5} and PM₁₀ in Turin in Italy and underlined
4
5 the necessity of primary prevention improvement to reduce nitrated molecules air pollution. In particles,
6
7 mutagenicity and carcinogenicity are mainly linked to 1-nitropyrene, 4-nitropyrene, 1,6-dinitropyrene,
8
9 1,8-dinitropyrene, and 6-nitrochrysene (2011). 1-nitropyrenene, classified as a probable human
10
11 carcinogen, is predominately produced in the exhaust of diesel engine, and has been reported as a
12
13 molecular marker of diesel exhausts exposure (Miller-Schulze *et al.* 2016). A study realized on
14
15 Hepa1c1c7 cells exposed to diesel exhaust particle extracts and 3 N-PAHs, showed the following potency
16
17 of apoptosis induction: 1,3-dinitropyrene > 1-nitropyrene ≫ DEPE ≫ 1,8-dinitropyrene, by inducing
18
19 CYP1A1 and activating various intracellular signaling pathways related to apoptosis (Landvik *et al.*
20
21 2007). N-PAHs derived from coke oven emissions extracts, have been able to generate adducts in primary
22
23 rat hepatocytes and in human lung tumor cell line derived from Clara cells (NCI-H322 cells) (Shwarz
24
25 1998). 3-nitrobenzanthrone is another N-PAHs environmental mutagen found in diesel exhaust fumes and
26
27 airborne particulates. It is considered as an environmental risk factor for Human lung cancer in urban
28
29 areas and is known to produce several DNA adducts and stand breaks in mammalian cells, micronucleus
30
31 formation in mouse peripheral blood reticulocytes, and to induce lung tumors in experimental animals
32
33 (Enya *et al.* 1997; Arlt *et al.* 2004; Arlt *et al.* 2004; Lamy *et al.* 2004; Nagy *et al.* 2005;
34
35 Phouongphouang *et al.* 2000; Nagy *et al.* 2005; Kawanishi *et al.* 2013). Metabolism of 3-
36
37 nitrobenzanthrone is mediated through cytosolic nitro-reductases, followed by activation by N-
38
39 acetyltransferase and sulfotransferases leading to the formation of reactive intermediates that can form
40
41 covalent bonds with DNA. Some studies have investigated the role of N-PAHs metabolites; amino-PAHs
42
43 as biomarkers of exposures to airborne particles and vehicle exhausts, including in their chemical
44
45 composition N-PAHs. Associations between urinary amino-PAHs were observed with vehicle exhausts
46
47 related PM_{2.5} as well as with a biomarker of oxidative DNA damage (Neophytou *et al.* 2014; Miller-
48
49 Schulze *et al.* 2016; Laumbach *et al.* 2009; Miller-Schulze *et al.* 2013).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

5.3. Toxicity of O-PAHs

Studies dealing with *in-vivo* and *in-vitro* effects of O-PAHs are very recent and very limited, compared to those studying the effects of N-PAHs, that why, understanding and deepening toxicity mechanisms of O-PAHs is very important. Mechanisms underlying their toxicity are complex and far from fully understood (Lundstedt *et al.* 2007). Unlike some transient organic compounds, O-PAHs represent a family of persistent compounds, thus their importance in the field of research and they should be taken into consideration during risk assessment (Lundstedt *et al.* 2007; Cerniglia 1997; Kochany *et al.* 1994). O-PAHs can have high toxicity even at low concentrations, due to their direct acting mutagenicity and carcinogenicity (Walgraeve *et al.* 2010; EHC 2003). It was described that some O-PAHs can be involved in the generation of Reactive Oxygen Species (ROS), such as polycyclic aromatic quinones, inducing oxidative stress and leading to allergic diseases (Sklorz *et al.* 2007), and can induce inflammatory reactions in human cells (Benbrahim-Tallaa *et al.* 2012). O-PAHs are widely present in the environment, especially in atmosphere; O-PAHs can be found on airborne and diesel particles and show an overall affinity for fine PM_{2.5} particle-association. Numerous *in-vitro* and *in-vivo* studies have described the toxicity, notably, the mutagenicity and carcinogenicity of O-PAHs (table 9). Zebrafish embryos 6 to 120 hours Post Fertilization (HPF) were exposed to a dilution series of 38 different O-PAHs and AHR activation was determined via CYP1A immunohistochemistry. Results revealed differential AhR dependency and a prominent role for oxidative stress in the toxicity mechanisms (Knecht *et al.* 2013). Another study using zebrafish, showed that exposure to benz[*a*]anthracene-7,12-dione, induced marked perturbations and affected protein biosynthesis, mitochondrial function, neural development, vascular development and cardiac function (Elie *et al.* 2015). O-PAHs are up to now not monitored by international agencies despite the toxic properties of these derivatives. O-PAHs, like N-PAHs can be found in diesel exhaust particles and several studies demonstrated significant correlations between O-PAHs concentrations and cardiovascular, neurodegenerative and pulmonary diseases (Layshock *et al.* 2010; Burtscher *et al.* 2012; Levesque *et al.* 2011; Nemmar *et al.* 2011; Channell *et al.* 2012). O-PAHs concentrations have been highly correlated with ROS formation and increased oxygen free radical

1 formation (Sklorz *et al.* 2007), and it was shown that increasing ROS caused oxidative stress and
2
3 induction of anti-oxidative enzymes. Failure to scavenge ROS may cause lipid peroxidation, which was
4
5 indicated by the production of malonaldehyde (MDA). A study realized on RAW264.7 cells showed that
6
7 9-Fluorenone was able to inhibit the transcription of IL-6, but without significant inhibition on
8
9 phagocytosis in contrast to 1 nitropyrene, a member of N-PAHs. In addition, stable SOD levels during 9-
10
11 Fluorenone exposure confirmed that no oxidative stress was detected and, consequently, that no oxidative
12
13 damage to the polyunsaturated fatty acids occurred (Wang *et al.* 2017). Niu *et al.* (2017) have developed
14
15 a new approach for the evaluation of relationships between air-quality and cell toxicity. A549 cells have
16
17 been exposed to fine aerosol extracts, collected in, China (Beijing, Tianjin, Shijiazhuang, and Hengshui)
18
19 during winter 2015. Effects of the oxygenated derivatives (O-PAHs) in PM_{2.5} on cell cultures were the
20
21 major focus of this study and it was found a decline in cell viability, an increase in nitric oxide, and tumor
22
23 necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) production (Niu *et al.* 2017). Another study on the
24
25 same cell line in air-liquid interface models focused on the effects of diesel exhaust including in their
26
27 composition O-PAHs in addition to PAHs and N-PAHs. 24 hours after exposure, an increased oxidative
28
29 stress response and a decrease in cell viability were observed (Kooter *et al.* 2013).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **5.4. Toxicity of OH-PAHs and PASHs**

41
42 Despite OH-PAHs, like PASHs, have not been studied as extensively as PAHs, N-PAHs and O-
43
44 PAHs, some studies have shown the potentiality of such compounds to induce toxicity and
45
46 carcinogenicity. Table 9 describes some studies of OH-PAHs and PASHs toxicity. Wang *et al.* (2009)
47
48 have shown binding interactions of 26 OH-PAHs with DNA by electrochemical displacement method and
49
50 atomic force microscopy (Wang *et al.* 2009). Several OH-PAHs were shown to have estrogenic and anti-
51
52 estrogenic activities and some studies have been conducted to evaluate the estrogenic and anti-estrogenic
53
54 activities of OH-PAHs such as hydroxybenzo[*a*]pyrene. In 2007, Hayakawa *et al.* raised the possibility of
55
56 predicting the estrogenic/anti-estrogenic activities of OH-PAHs from their structural characteristics
57
58 (Hayakawa *et al.* 2007). 1- and 2-OHB[*a*]Ps bound strongly to estrogen receptor in rat cytosol but 4-, 5-,
59
60
61
62
63
64
65

1 6- and 12-OHB[a]Ps poorly interact. Both 3- and 10-OHB[a]Ps showed antagonistic activities to a
2
3 mixture of estrogen receptor α and β (Charles *et al.* 2000). OH-PAHs can be found in cigarette smoke
4
5 condensates and Kamiya *et al.* (2005) was the first to identify estrogenic activities of cigarette smoke
6
7 condensates obtained from the extraction of particulate matters from cigarette smoke after exposure of
8
9 yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* Y190) expressing the human estrogen receptor α (ER α) (Kamiya *et al.*
10
11 *al.* 2005). Senger *et al.* and McDougal *et al.* have demonstrated that antiestrogenic activities of PAHs can
12
13 be mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Maria *et al.* 2000; McDougal *et al.* 2001). Indeed,
14
15 OH-PAHs can be easily formed in the human and animal body in the presence of cytochrome P450
16
17 enzymes as well as after chemical reactions in the atmosphere (Kishikawa *et al.* 2004, Stcha *et al.* 2000,
18
19 Bostrom *et al.* 2002).

25 PASHs (thia-PAHs or thia-arenes) were tested for the first time in 1981 regarding to their
26
27 mutagenicity using the Ames test, and some of them, especially the benzo[b]phenanthro[4,5-
28
29 bcd]thiophene, were found to possess high activities (Li *et al.* 2012). Swart *et al.* (2009) evaluated
30
31 mutagenicity, stable DNA adducts, and abasic sites induced in Salmonella (TA98, TA100, and TA104)
32
33 by phenanthro[3,4-*b*]- and phenanthro[4,3-*b*]thiophenes, sulfur analogs of benzo[c]phenanthrene. It was
34
35 the first study illustrating the potential importance of abasic sites in the mutagenicity of thia-PAHs.
36
37 Phenanthro[3,4-*b*]-thiophenes was not mutagenic in TA104, and the two isomeric forms (P[3,4-*b*]T and
38
39 P[4,3-*b*]T) were apparently activated differently (Swart *et al.* 2009). Mutagenic and carcinogenic activities
40
41 of PASHs were highly influenced by the presence and the position of the sulfur heteroatom. PASHs with
42
43 a peripheral thiophene ring are mutagenic with high mutagenicity of tri- and tetra- cyclic PASHs (Jacob *et al.*
44
45 *al.* 1990, Pelroy *et al.* 1983). Methyl- substituted tri- and tetracyclic PASHs as well as nitro- substituted
46
47 tetracyclic PASHs were also demonstrated mutagenic (McFall *et al.* 1984; Laali *et al.* 2007). It was
48
49 reported in 2001 that 5-nitrobenzo[b]naphtho[2,1-*d*]thiophene has the ability to induce stable DNA
50
51 adducts (King *et al.* 2001). Due to the lower levels of PASHs in environmental samples, compared to
52
53 PAHs, PASHs have received little attention in literature (Mossner *et al.* 1999). Concerning particulate
54
55 matter, it was already mentioned that thia-arenes may increase the carcinogenic potential of
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 environmental matter, and fractions of PAHs with four to seven condensed rings containing thiaarenes
2
3 have shown a significantly increased in carcinogenic potency compared to other sulfur-free PAH fractions
4
5 (Becker *et al.* 1998).
6
7
8
9

10 **6. Conclusion**

11
12 While 16 US-EPA PAHs are commonly studied in many countries, PAHs derivatives in
13
14 atmosphere are rarely monitored by international agencies. Most of toxicological studies of PAHs
15
16 derivatives have proved that they are more toxic than their parent PAHs, because of their direct toxic
17
18 potency, whereas PAHs require first an enzymatic activation. The need to reduce their emissions and to
19
20 precisely monitor their concentration in environment appears very important. While several studies
21
22 investigated the toxic effects of N-PAHs, studies dealing with the *in-vivo* and *in-vitro* effects of O-PAHs
23
24 and OH-PAHs are recent and very limited. Concerning PASHs, and due to the lower levels in
25
26 environmental samples, they have received little attention. This is the reason why the deepening of the
27
28 mechanisms of toxicity of PASHs is very important in the future. In addition, further investigations on
29
30 health effects of exposure to PAHs derivatives mixtures are needed. The potential risk of PAH exposure
31
32 based on TEQ can be underestimated if the interaction of some PAHs is synergistic rather than additive
33
34 and chemical degradation of PAHs by ambient oxidants in the atmosphere could also underestimate the
35
36 potential risks due to reduced measured PAHs levels, that's why it's important to develop a potential risk
37
38 based on PAHs derivatives and their concentrations in atmosphere.
39
40
41
42
43
44
45

46 **Acknowledgments:**

47
48 This work was supported by the National Council of Scientific Research in Lebanon, especially the
49
50 Lebanese Atomic Energy Commission. The "Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le
51
52 Vivant" (UCEIV- EA4492) and the "IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé" (IMPECS-
53
54 EA4483) participates in the CLIMIBIO project, which is financially supported by the Hauts-de-France
55
56 Region Council, the Ministry of Higher Education and Research, and the European Regional
57
58 Development Funds."
59
60
61
62
63
64
65

References :

- 1
2
3 Abbas I., Verdin A., Escande F., Saint-Georges F., Cazier F., Mulliez P., Courcot D., Shirali P., Gosset
4 P., and Garçon G., "In-vitro short-term exposure to air pollution PM_{2.5-0.3} induced cell cycle
5 alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model, " *Environmental Research*,
6 vol. 147, p.146-158, 2016.
- 7
8 Abramsson-Zetterberg L., and Maurer B.M., "Fluoranthene and phenanthrene, two predominant PAHs
9 in heat-prepared food, do not influence the frequency of micro nucleated mouse erythrocytes
10 induced by other PAHs", *Toxicology report*, vol. 5, p.1057-1063, 2015
- 11
12 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Case Studies in Environmental Medicine.
13 Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)," *Agency for Toxic Substances and Disease*
14 *Registry (ATSDR)*, 2009.
- 15
16 Air Quality in Europe (A.Q. i. E) "Technical Report No 28/2016," Copenhagen, 2016.
- 17
18 Alam M.S., Keyte I.J., Yin J., Stark C., Jones A.M. and Harrison R.M., "Diurnal variability of polycyclic
19 aromatic compound (PAC) concentrations: relationship with meteorological conditions and inferred
20 sources, " *Atmos. Environ.*, vol. 122, p. 427–436, 2015.
- 21
22 Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H. and Villenave E., "Polycyclic aromatic hydrocarbons
23 (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (South of
24 France): Concentrations and sources," *Science of the Total Environment* , vol. 384, p. 280–292,
25 2007.
- 26
27 Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H. and Villenave E., "Simultaneous analysis of oxygenated
28 and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust)
29 and on natural ambient air samples by gas chromatography–mass spectrometry with negative ion
30 chemical ionisation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1121, p. 106–113, 2007.
- 31
32 Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H., Villenave E. and Jaffrezo J., "Nitrated and oxygenated
33 derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys.
34 Part 1: concentrations, sources and gas/particle partitioning," *Atmospheric Environment*, vol. 42, p.
35 43-54, 2008 a.
- 36
37 Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H., Villenave E. and Jaffrezo J., "Nitrated and oxygenated
38 derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys.
39 Part 1: concentrations, sources and gas/particle partitioning," *Atmos. Environ.*, vol. 42, p. 43-54,
40 2008.
- 41
42 Albinet A., Nalin F., Tomaz S., Beaumont J. and Lestremau F., "A simple QuEChERS-like extraction
43 approach for molecular chemical characterization of organic aerosols: application to nitrated and
44 oxygenated PAH derivatives (NPAH and OPAH) quantified by GC–NICIMS," *Anal Bioanal Chem*,
45 vol. 406, p. 3131–3148, 2014.
- 46
47 Alexandrov K., Rojas M. and Satarug S., " The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of
48 smokers and approaches to preventing its formation," *Toxicol. Lett.*, vol. 198, p. 63-68, 2010.
- 49
50 Alves C. A., Vicente A. M., Custódio D., Cerqueira M., Nunes T., Pio C., Lucarelli F., Calzolari G., Nava
51 S., Diapouli E., Eleftheriadis K., Querol X. and Bandowe B. M., "Polycyclic aromatic hydrocarbons
52 and their derivatives (nitro-PAHs, oxygenated PAHs, and azaarenes) in PM_{2.5} from Southern
53 European cities," *Science of the Total Environment*, vol. 595 , p. 494–504, 2017.
- 54
55 Alves C., Vicente A., Gomes J., Nunes T., Duarte M. and Bandowe B., "Polycyclic aromatic
56 hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in
57 size-fractionated particles emitted in an urban road tunnel," *Atmospheric Research*, vol. 180, p.
58 128–137, 2016.
- 59
60 Amador-Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Miranda J. and Vera-Avila L.E., "Organic compounds of
61 PM_{2.5} in Mexico Valley: spatial and temporal patterns, behavior and sources, " *Sci. Total Environ.*,
62 vol. 409, p. 1453–65, 2011.
- 63
64
65

- 1 Anastasopoulos A., Wheeler A., Karman D. and Kulka R., "Intraurban concentrations, spatial variability
2 and correlation of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PM_{2.5}," *Atmos. Environ.*,
3 vol. 59, p. 272–283, 2012.
- 4 Arey J., Atmospheric reactions of PAHs including formation of nitroarenes. In "The handbook of
5 environmental chemistry, PAHs and related compounds", Berlin, 1998.
- 6
- 7
- 8 Arlt V., Cole K. and Phillips D., "Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-
9 damaging species in human B-lymphoblastoid MCL-5 cells" *Mutagenesis*, vol. 19, p. 149–156,
10 2004.
- 11
- 12 Arlt V., Zhan L., Schmeiser H., Honma M., Hayashi M., Phillips D. and Suzuki T., "DNA adducts and
13 mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta
14 Mouse," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 43, p. 186–195, 2004.
- 15
- 16 Armstrong B., Hutchinson E., Unwin J. and Fletcher T., "Lung cancer risk after exposure to polycyclic
17 aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis," *Environ Health Perspect*, vol. 112(9), p. 970–
18 8, 2004.
- 19
- 20
- 21 Atkinson R. and Arey J., "Mechanisms of the gas-phase reactions of aromatic hydrocarbons and PAHs
22 with OH and NO₃ Radicals," *Polycycl. Aromat. Comp.*, vol. 27, p. 15-40, 2007.
- 23
- 24 Atkinson R., Arey J., "Lifetimes and fates of toxic air contaminants in California's atmosphere. Final
25 report to the California air resources board", 1997.
- 26
- 27 Avagyan R., Nystrom R., Lindgren R., Boman C. and Westerholm R., "Particulate hydroxy-PAH
28 emissions from a residential wood log stove using different fuels and burning conditions," *Atmos.*
29 *Environ.*, vol. 140, p. 1-9, 2016.
- 30
- 31 Bach P., Kelley M., Tate R. and McCrory D., "Screening for lung cancer: a review of the current
32 literature," *Chest*, vol. 123, p. 72–82, 2003.
- 33
- 34 Bacolod E. T., Uno S., Tanaka H. and Koyama J., "Micronuclei and other nuclear abnormalities induction
35 in erythrocytes of marbled flounder, *Pleuronectes yokohamae*, exposed to dietary nitrated
36 polycyclic aromatic hydrocarbons," *Japanese Journal of Environmental Toxicology*, vol. 16(2), p.
37 79-89, 2013.
- 38
- 39
- 40 Bacolod E.T., Uno S., Villamor S.S., and Koyama J., "Oxidative stress and genotoxicity biomarker
41 responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-
42 nitropyrene, " *Marine Pollution Bulletin*, in press, 2017.
- 43
- 44
- 45 Bae S., Yi S. and Kim Y., "Temporal and spatial variations of the particle size distribution of PAHs and
46 their dry deposition fluxes in Korea," *Atmos Environ*, vol. 36, p. 5491- 5500, 2002.
- 47
- 48 Bamford H. and Baker J., "Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban
49 and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region.," *Atmos. Environ.*, vol. 37, p. 2077–2091,
50 2003.
- 51
- 52 Bandowe B. A., Meusel H., Huang R.J., Ho K., Cao J., Hoffmann T. and Wilcke W., "PM_{2.5}-bound
53 oxygenated PAHs, nitro-PAHs and parent-PAHs from the atmosphere of a Chinese megacity:
54 Seasonal variation, sources and cancer risk assessment," *Science of the Total Environment*, vol.
55 473–474, p. 77–87, 2014.
- 56
- 57
- 58 Bandowe B. M. and Meusel H., "Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the
59 environment – A review," *Science of the Total Environment* , vol. 581–582, p. 237–257, 2017.
- 60
- 61 Bandowe B., Lueso M. and Wilcke W., "Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes in
62
63
64
65

- 1 urban soils: a comparison of a tropical city (Bangkok) with two temperate cities (Bratislava and
2 Gothenburg).," *Chemosphere* , vol. 107, p. 407–414, 2014 a.
- 3
4 Bari M.A., Baumbach G., Kuch B. and Scheffknecht G., "Particle - phase concentrations of polycyclic
5 aromatic hydrocarbons in ambient air of rural residential areas in southern Germany" *Air Quality,
6 Atmosphere & Health*, vol. 3(22), p. 103 – 116, 2010.
- 7
8 Barrado A., Garcia S., Barrado E. and Perez R., "PM_{2.5}-bound PAHs and hydroxy- PAHs in atmospheric
9 aerosol samples: correlations with season and with physical and chemical factors," *Atmos. Environ.*,
10 vol. 49, p. 224–232, 2012.
- 11
12 Barrado A., Garcia S., Castrillejo Y. and Barrado E., "Exploratory data analysis of PAH, nitro-PAH and
13 hydroxy-PAH concentrations in atmospheric PM₁₀-bound aerosol particles,"*Correl. Phys. Chem.
14 Factors, Atmos. Environ.*, vol. 67, p. 385–393, 2013.
- 15
16 Barrado A., Garcia S., Castrillejo Y. and Perez R., "Hydroxy-PAH levels in atmospheric PM₁₀ aerosol
17 samples correlated with season, physical factors and chemical indicators of pollution," *Atmos. Poll.
18 Res.*, vol. 3, p. 81–87, 2012.
- 19
20
21 Becker G., Nilsson U., Colmsjo A. and Ostman C., " Determination of polycyclic aromatic sulfur
22 heterocyclic compounds in airborne particulate by gas chromatography with atomic emission and
23 mass spectrometric detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 826, p. 57–66, 1998.
- 24
25 Beland F. A., Heflich R. H., Howard P. C. and Fu P. P., "The *in-vitro* metabolic activation of nitro
26 polycyclic aromatic hydrocarbons. In Polycyclic Aromatic Hydro- carbons and Carcinogenesis.,"
27 *American Chemical Society, Washington, DC.*, p. 371-396, 1985.
- 28
29 Benbrahim-Tallaa L., Baan R., Grosse Y., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Guha N.,
30 Loomis D., Straif K. and W. Int Agcy Res Canc Monograph, "Carcinogenicity of diesel-engine and
31 gasoline-engine exhausts and some nitroarenes.," *Lancet Oncol.*, vol. 13, p. 663-664, 2012.
- 32
33 Benisek M., Blaha L. and Hilscherova K., "Interference of PAHs and their N-heterocyclic analogs with
34 signaling of retinoids in vitro," *Toxicology in Vitro*, vol. 22 , p. 1909–1917, 2008.
- 35
36 Benisek M., Kubincova P., Blaha L. and Hilscherova K., "The effects of PAHs and N-PAHs on retinoid
37 signaling and Oct-4 expression in vitro," *Toxicology Letters*, vol. 200, p. 169–175, 2011.
- 38
39 Beoletto V., Oliva M. M., Marioli J., Carezzano M. and Demo M., Chapter 14 – Antimicrobial Natural
40 Products Against Bacterial Biofilms, 2016, p. 291–307.
- 41
42 Bezabeh D., Bamford H., Shantz M.M. and Wise S.A., "Determination of nitrated polycyclic aromatic
43 hydrocarbons in diesel particulate- related standard reference materials by using gas
44 chromatography/ mass spectrometry with negative ion chemical ionization.," *Anal Bioanal Chem.* ,
45 vol. 375, p. 381–388, 2003.
- 46
47
48 Bi X., Simoneit B., Sheng G. and Fu J., "Characterization of molecular markers in smoke from residential
49 coal combustion in China," *Fuel*, vol. 87, p. 112–119, 2008.
- 50
51 Bian Q., Alharbi B., Collett J. Jr., Kreidenweis S. and Pasha M. J., "Measurements and source
52 apportionment of particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in Riyadh,
53 Saudi Arabia", *Atmospheric Environment*, vol. 137, p.186-198, 2016.
- 54
55 Billet S., Garçon G., Dagher Z., Verdin A., Ledoux F., Courcot D., Aboukais A. and Shirali P., "Ambient
56 particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic
57 fraction in human lung epithelial cells (A549), " *Environ. Res.*, 105 (2), p. 212–223, 2007.
- 58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Birgul A. and Tasdemir Y., "Concentrations, gas-particle partitioning, and seasonal variations of
2 polycyclic aromatic hydrocarbons at four sites in Turkey," *Archives of Environmental
3 Contamination and Toxicology*, vol. 68(1), p. 46–63, 2015.
- 4 Bockhorn H., "Combustion Generated Fine Carbonaceous Particles: Proceedings of an International
5 Workshop," in *Edtion ed.: KIT Scientific Publishing, ISBN 9783866444416*, Anacapri, May 13-16,
6 2007.
- 7 Boers D., Zeegers M., Swaen G., Kant I. and Van den Brandt P., "The influence of occupational exposure
8 to pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, diesel exhaust, metal dust, metal fumes, and
9 mineral oil on prostate cancer: a prospective cohort study," *Occup Environ Med*, vol. 62(8), p. 531–
10 537, 2005.
- 11 Boffetta P., Jourenkova N. and Gustavsson P., "Cancer risk from occupational and environmental
12 exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons," *Cancer Causes Control*, vol. 8(3), p. 444–472,
13 1997.
- 14 Borgie M., Dagher Z., Ledoux F., Verdin A., Cazier F., Martin P., Hachimi A., Shirali P., Greige-Gerges
15 H. and Courcot D., "Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon:
16 Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in
17 human bronchial epithelial cells," *Environmental Pollution*, vol. 205, p. 250-260, 2015.
- 18 Bortey-Sam N., Ikenaka Y., Akoto O., Nakayama S.M.M., Asante K.A., Baidoo E., Obirikorang C.,
19 Saengtienchai A., Isoda N., Nimako C., Mizukawa H. and Ishizuka M., "Oxidative stress and
20 respiratory symptoms due to human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in
21 Kumasi, Ghana," *Environmental Pollution*, vol. 228, 311-320, 2017.
- 22 Bostrom C., Gerde P., Hanberg A., Jernstrom B., Johansson C., Kyrklund T., Rannug A., Tornqvist M.,
23 Victorin K. and Westerholm R., "Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic
24 aromatic hydrocarbons in the ambient air," *Environ. Health Perspect.*, vol. 110, p. 451-488, 2002.
- 25 Brorström-Lunden E., Remberger M., Kaj L., Hansson K., Palm Cousins A., Andersson H., Haglund P.,
26 Ghebremeskel M. and Schlabach M., "Results from the Swedish National Screening Programme
27 2008: Screening of Unintentionally Produced Organic Contaminants," Swedish Environmental
28 Research Institute (IVL) report B1944, Göteborg, Sweden 2010.
- 29 Brown A.S and Brown R. J., "Correlations in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentrations in
30 UK ambient air and implications for source apportionment." *J Environ Monit.*, vol. 14(8):2072-82, 2012
- 31 Burtscher H. and Schüepp K., "The occurrence of ultrafine particles in the specific environment of
32 children," *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 13, p. 89–94, 2012.
- 33 Burtscher H. and Schüepp K., "The occurrence of ultrafine particles in the specific environment of
34 children.," *Paediatr. Respir. Rev.*, vol. 13, p. 89–94, 2012.
- 35 Cachon B.F., Firmin S., Verdin A., Ayi-Fanou L., Billet S., Cazier F., Martin P.J., Aissi F., Courcot D.,
36 Sanni A. and Shirali P., "Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial
37 epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM_{4-2.5}) collected from
38 Cotonou, Benin," *Environ. Pollut.*, vol. 185, 340–351, 2014.
- 39 Carrara M., Wolf J. C. and Niessner R., "Nitro-PAH formation studied by interacting ar- tificially PAH-
40 coated soot aerosol with NO₂ in the temperature range of 295–523," *K. Atmos. Environ.*, vol. 44, p.
41 3837–3885, 2010.
- 42 Castells P., Santos F. and Galceran M., "Development of a sequential supercritical fluid extraction
43 method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons
44 in urban aerosols," *Journal of Chromatography A*, vol. 1010, p. 141–151, 2003.
- 45 Cazaunau M., Le Ménach K., Budzinski H. and Villenave E., " Atmospheric heterogeneous reactions of
46 benzo[*a*]pyrene," *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie*, vol. 224, p. 1151–1170, 2010.
- 47 Cazier F., Genevray P., Dewaele D., Nouali H., Verdin A., Ledoux F., Hachimi A., Courcot L., Billet S.,
48 Bouhsina S., Shirali P., Garçon G. and Courcot D., "Characterisation and seasonal variations of

- 1 particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas: Organic compounds," *Journal of*
2 *environmental Sciences*, vol. 44, p. 45–56, 2016.
- 3 Cecinato A., Guerriero E., Balducci C. and Muto V., "Use of the PAH fingerprints for identifying
4 pollution sources," *Urban Climate*, vol. 10, p. 630–643, 2014.
- 5 Cerniglia C., "Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future
6 applications in bioremediation.," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, p. 324–333, 1997.
- 7 Chae Y., Thomas T., Guengerich F., Fu P. and El Bayoumy K., "Comparative metabolism of 1-, 2-, and
8 4-nitropyrene by human hepatic and pulmonary microsomes," *Cancer Res.*, vol. 59, p. 1473–1480,
9 1999.
- 10 Channell M., Paffett M., Devlin R., Madden M. and Campen M., "Circulating factors induce coronary
11 endothelial cell activation following exposure to inhaled diesel exhaust and nitrogen dioxide in
12 humans: evidence from a novel translational in vitro model.," *Toxicol. Sci.*, vol. 127, p. 179–186,
13 2012.
- 14 Charles G. D., Bartels M. J., Zacharewski T. R., Gollapudi B. B., Freshour N. L. and Carney E. W.,
15 "Activity of benzo[*a*]pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor α receptor
16 gene assay.," *Toxicol. Sci.*, vol. 55, p. 320–326, 2000.
- 17 Châtel A., Faucet-Marquis V., Pfohl-Leszkowicz A., Gourlay-Francé C. and Vincent-Hubert F., "DNA
18 adduct formation and induction of detoxification mechanisms in *Dreissena polymorpha* exposed to
19 nitro-PAHs," *Mutagenesis*, vol. 29(6), p. 457–465, 2014.
- 20 Chen C., Zhao B., Zhou W., Jiang X. and Tan Z. A., "methodology for predicting particle penetration
21 factor through cracks of windows and doors for actual engineering application," *Building and*
22 *Environment*, vol. 47, p. 339-348, 2012.
- 23 Chen Y., Zhi G., Feng Y., Tian C., Bi X., Li J. and Zhang G., "Increase in polycyclic aromatic
24 hydrocarbon (PAH) emissions due to briquetting: a challenge to the coal briquetting policy.,"
25 *Environ. Pollut.*, vol. 204, p. 58-63, 2015.
- 26 Chetwittayachan T., Shimazaki D. and Yamamoto K., "A comparison of temporal variation of particle-
27 bound polycyclic aromatic hydrocarbons (pPAHs) concentration in different urban environments:
28 Tokyo, Japan, and Bangkok, Thailand," *Atmos Environ*, vol. 36, p. 2027-2037, 2002.
- 29 Choi J.K., Heo J.B., Ban S.J., Yi S.M. and Zoh K.D., "Chemical characteristics of PM_{2.5} aerosol in
30 Incheon, Korea," *Atmos. Environ.*, vol. 60, 583-592, 2012.
- 31 Chuesaard T., Chetiyakornkul T., Kameda T., Hayakawa K. and Toriba A., "Influence of biomass
32 burning on the levels of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in
33 Chiang Mai, Thailand," *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 14, p. 1247–1257, 2014.
- 34 Chuesaard T., Chetiyakornkul T., Kameda T., Hayakawa K. and Toriba A., "Influence of biomass
35 burning on the levels of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in
36 Chiang Mai, Thailand," *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 14, p. 1247–1257, 2014.
- 37 Chung M.Y., Lazaro R.A., Lim D., Jackson J., Lyon J., Rendulic D. and Hasson A.S., "Aerosol-borne
38 quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts," *Environ. Sci.*
39 *Technol.*, vol. 40, p. 4880–4886, 2006.
- 40 Clapp R., Jacobs M. and Loechler E., "Environmental and occupational causes of cancer: new evidence
41 2005–2007," *Rev Environ Health*, vol. 23(1), p. 1–37, 2008.
- 42 Cochran R., Dongari N., Jeong H., Beranek J., Haddadi S., Shipp J. and Kubatova A., "Determination of
43 polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products.," *Anal.*
44 *Chim. Acta*, vol. 740, p. 93-103, 2013.
- 45 Crane J., Grosenheider K. and Wilson C., "Contamination of stormwater pond sediments by polycyclic
46 aromatic hydrocarbons (PAHs) in Minnesota: the role of coal tar-based sealcoat products as a
47 source of PAHs: Minnesota Pollution Control Agency," 2010.
- 48 Dat N. D. and Chang M. B., "Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 and control technologies," *Science of the Total Environment*, vol. 609, p. 682–693, 2017.
- 2 Dergham M., Lepers C., Verdin A., Cazier F., Billet S., Courcot D., Shirali P. and Garçon G., "Temporal–
3 spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5–}
4 0.3) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B), " *Environmental*
5 *Research*, vol. 137 p. 256–267, 2015
- 6 Dieme D., Cabral-Ndior M., Garçon G., Verdin A., Billet S., Cazier F., Courcot D., Diouf A., and Shirali,
7 P., "Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter
8 (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal)," *Environ. Res.*, vol. 113, p. 1–13, 2012.
- 9 Dietrich C. and Kaina B., "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and
10 tumor growth, " *Carcinogenesis*, vol. 31(8), p. 1319-1328, 2010.
- 11
12
13
14
15 Diggs D., Huderson A., Harris K.L., Myers J.N., Banks L.D., Rekhadevi P.V. and Ramesh A.,
16 "Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective," *J Environ Sci Health*
17 *C Environ Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, vol. 29(4), p. 324–357, 2011.
- 18 Dihl R., Bereta M., Do Amaral V., Lehmann M., Reguly M. and De Andrade H., "Nitropolycyclic
19 aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of
20 *Drosophila melanogaster*," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, p. 2344–2348, 2008.
- 21 Djuric Z. and McGunagle D., " Differences in reduction of 1,6-dinitropyrene and 1-nitro-6- nitrosopyrene
22 by rat liver cytosolic enzymes and formation of oxygen-reactive metabolites by nitrosoreduction,"
23 *cancer letters*, vol. 48, p. 13-18, 1989.
- 24 Drwala E., Raka A., Grochowalski A., Milewicz T., Gregoraszczyk E.L., "Cell-specific and dose-
25 dependent effects of PAHs on proliferation, cell cycle, and apoptosis protein expression and
26 hormone secretion by placental cell lines, " *Toxicology Letters*, vol. 280, p. 10–19, 2017.
- 27 Dusek B., Hajslova J. and Kocourek V., "Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons
28 and their precursors in biotic matrices," *J Chromatogr A*, vol. 982, p. 127-143, 2002.
- 29 Dutcher J. S., Sun J. D., Bechtold W. E. and Unkefer C., " Excretion and Metabolism of 1-Nitropyrene in
30 Rats after Oral or Intraperitoneal Administration," *Fundamental and applied Toxicology*, vol. 5, p.
31 287-296, 1985.
- 32 Edwards S., Jedrychowski W., Butscher M., Camann D., Kieltyka A., Mroz E., Flak E., Li Z., Wang S.,
33 Rauh V. and Perrera F., "Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and
34 children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland.," *Environ Health*
35 *Perspect.*, vol. 118(9), p. 1326–1331, 2010.
- 36 EHC - Environmental Health Criteria, 2003. In: Kielhorn J., Wahnschaffe U., Mangelsdorf I. (Eds.),
37 Selected Nitro- and Nitro-oxy-polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Fraunhofer Institute of
38 Toxicology and Aerosol Research, Hanover, Germany. WHO Library (464 p.)
- 39 Eiguen-Fernandez A., Miguel A., Lu R., Purvis K., Grant B., Mayo P., Di Stefano E., Cho A. and Froines
40 J., "Atmospheric formation of 9, 10-phenanthraquinone in the Los Angeles air basin," *Atmos.*
41 *Environ.*, vol. 42, p. 2312–2319, 2008.
- 42 Elie M. R., Choi J., Nkrumah-Elie Y. M., Gonnerman G. D., Stevens J. F. and Tanguay R. L.,
43 "Metabolomic analysis to define and compare the effects of PAHs and oxygenated PAHs in
44 developing zebrafish," *Environmental Research*, vol. 140, p. 502–510, 2015.
- 45 Enya T., Suzuki H., Watanabe T., Hirayama T. and Hisamatsu Y., "3- Nitrobenzanthrone, a powerful
46 bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne
47 particulates," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 31, p. 2772–2776, 1997.
- 48 Falcon-Rodriguez C. I., Osornio-Vargas A. R., Ada-Ovalle I. and Segura-Medina P., "Aeroparticles,
49 Composition, and Lung Diseases," *Frontiers in Immunology*, vol. 7(3), 2016.
- 50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Fang G., Wu Y., Chen J., Chang C. and Ho T., "Characteristic of polycyclic aromatic hydrocarbon
2 concentrations and source identification for fine and coarse particulates at Taichung Harbor near
3 Taiwan Strait during 2004–2005.," *Sci. Total Environ.*, vol. 366, p. 729–738, 2006.
- 4 Fang G., Wu Y., Chen M., Ho T., Huang S. and Rau J., "Polycyclic aromatic hydrocarbons study in
5 Taichung, Taiwan, during 2002–2003," *Atmospheric Environment*, vol. 38, p. 3385–3391, 2004.
- 6 Farren N. J., Ramirez N., Lee J., Finessi E., Lewis A. C. and Hamilton J. F., "Estimated Exposure Risks
7 from Carcinogenic Nitrosamines in Urban Airborne Particulate Matter," *Environ. Sci. Technol.*, vol.
8 49, p. 9648–9656, 2015.
- 9 Fu P. P., Chou M. W. and Beland F. A., "Effectsof nitro substitution on the in vitro metabolic activation
10 of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Polycyclic Aromatic-Hydrocarbon Carcinogenesis:
11 Structure Activity Relationships.," *CRC Press, Boca Raton, FL.*, vol. 2, p. 38-65, 1988.
- 12 Fu P. R., Herreno-Saenz D., Von Tungein L.S., Lay J. O., Wu Y.S., Lai J.S. and Frederick E. E., " DNA
13 Adducts and Carcinogenicity of Nitro-polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Environmental Health
14 Perspectives*, vol. 102(6), p. 177-183, 1994.
- 15 Garcia K. O., Teixeira E. C., Agudelo-Castaneda D. M., Braga M., Alabarse P. G., Wiegand F.,
16 Kautzmann R. M. and Silva L. F., "Assessment of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM₁
17 near an area of heavy-duty traffic," *Science of the Total Environment*, vol. 479–480, p. 57–65, 2014.
- 18 Garrido A., Jime nezGuerrero P. and Ratola N., "Levels, trends and health concerns of atmospheric PAHs
19 in Europe," *Atmos. Environ.*, vol. 99, 474-484, 2014.
- 20 Garshick E., Laden F., Hart J., Rosner B., Smith T., Dockery D. and Speizer F., "Lung cancer in railroad
21 workers exposed to diesel exhaust," *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, p. 1539–1543, 2004.
- 22 Gonçalves C., Alves C., Fernandes A., Monteiro C., Tarelho L., Evtyugina M. and Pio C., "Organic
23 compounds in PM_{2.5} emitted from fireplace and woodstove combustion of typical Portuguese wood
24 species," *Atmos. Environ.*, vol. 45, p. 4533–4545, 2011.
- 25 Grova N., Salquebre G., Schroeder H. and Appenzeller B.M.R., "Determination of PAHs and OH-PAHs
26 in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry, " *Chem. Res.
27 Toxicol.*, vol. 24, p. 1653–1667, 2011.
- 28 Guillon A., "Étude de la composition isotopique moléculaire (d13C) comme traceur de source qualitatif et
29 quantitatif des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) particulaires dans l'atmosphère,"
30 Bordeaux, France, 2011.
- 31 Guo H., Lee S., Ho K., Wang X. and Zou S., "Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in
32 urban air of Hong Kong," *Atmospheric Environment*, vol. 37, p. 5307–5317, 2003.
- 33 Hafner W. D. and Hites R. A., "Effects of wind and air trajectory directions on atmospheric
34 concentrations of persistent organic pollutants near the Great Lakes," *Environ Sci Technol*, vol. 39,
35 p. 7817-7825, 2005.
- 36 Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Chung S. W., Kizu R., Toriba A., Kameda
37 T. and Tanga N., "Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and
38 Their Monohydroxylated Derivatives by Yeast Two-Hybrid Assay," *Journal of Health Science*, vol.
39 53(5), p. 562–570 , 2007.
- 40 Hayakawa K., Tang N., Kameda T. and Toriba A., "Atmospheric Behaviors of Polycyclic Aromatic
41 Hydrocarbons in East Asia," *Genes and Environment*, vol. 36(3), p. 152–159, 2014.
- 42 Haynes B., In: W. Bartock and A. Sarofim, Fossil Fuel Combustion:, New york: Wiley, 1991, p. 261–
43 326.
- 44 Hecht S., "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer.," *J Natl Cancer Inst* , vol. 91(14), p. 1194–1210,
45 1999.
- 46 Hegazi A., Andersson J. and El-Gayar M., "Fuel Process," *Technol.*, vol. 85, p. 1, 2003.
- 47 Hiena T. T., Thanh L. T., Kameda T., Takenaka N. and Bandow H., "Nitro-polycyclic aromatic
48 hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter in an urban area of a
49 tropical region: Ho Chi Minh City, Vietnam," *Atmospheric Environment*, vol. 41, p. 7715–7725,
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2007.

- Huang W., Huang B., Bi X., Lin Q., Liu M., Ren Z., Zhang G., Wang X., Sheng G. and Fu J., "Emission of PAHs, NPAHs and OPAHs from the residential honeycomb coal briquettes combustion," *Energy & Fuel*, vol. 28, p. 636–642, 2014a.
- Imaida K., Lee M., Land S., Wang C. and King C., "Carcinogenicity of ni- tropyrenes in the newborn female rat," *Carcinogenesis*, vol. 16, p. 3027–3030, 1995.
- Jacob J., "Sulfur Analogues of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Thia-arenes)," *Cambridge University Press, Cambridge, UK*, vol. 1990, p. 1–281.
- Jaegger Franco C. F., Fabri de Resende M., de Almeida Furtado L., Brasil T.F., Eberlin M.N. and Pereira Netto A. D., "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in street dust of Rio de Janeiro and Niteroi, Brazil: Particle size distribution, sources and cancer risk assessment," *Science of the Total Environment*, vol. 599–600, p. 305–313, 2017.
- Jakober C., Riddle S., Robert M., Destailats H., Charles M., Green P. and Kleeman M., "Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 4548–4554, 2007.
- Jankowiak R., Rogan E. and Cavalieri E., "Role of fluorescence line- narrowing spectroscopy and related luminescence-based techniques in the elucidation of mechanisms of tumor initiation by polycyclic aro- matic hydrocarbons and estrogens," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, p. 10266–10283, 2004.
- Jariyaposit N., Zimmermann K., Schrlau J., Arey J., Atkinson R., Yu T.W., Dashwood R., Tao S. and Simonich S., "Heterogeneous reactions of particulate matter- bound PAHs and NPAHs with NO₃/N₂O₅, OH radicals, and O₃ under simulated long- range atmospheric transport conditions: reactivity and mutagenicity," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, p. 10155–10164, 2014.
- Jinhuia X. and Lee F., "Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter," vol. 416, p. 111–115, 2000.
- Jong W. H., Kroese E., Vos J. and Loveren H., "Detection of immunotoxicity of benzo[a]pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats.," *Toxicol Sci*, vol. 50(2), p. 214–220, 1999.
- Jongeneelen F.J., "Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons.," *Ann. Occup. Hyg.*, vol. 45(1), p. 3–13, 2001.
- Jung K. H., Yan B., Chillrud S. N., Perera F. P., Whyatt R., Camann D., Kinney P. L. and Miller R. L., "Assessment of Benzo[a]pyrene-equivalent Carcinogenicity and Mutagenicity of Residential Indoor versus Outdoor Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposing Young Children in New York City," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 7, p. 1889-1900, 2010.
- Kaisarevic S., Dakic V., Hrubik J., Glisic B., Lubcke-von Varel U., Pogrmic-majkic S., Fa S., Teodorovic I., Brack W. and R. Kovacevic, "Differential expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in H4IIE rat hepatoma cells exposed to TCDD and PAHs," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 39(1), p. 358-368, 2015.
- Kameda T., "Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons and related com- pounds," *J Health Sci.*, vol. 57(6), p. 504-511, 2011.
- Kameda T., Azumi E., Fukushima A., Tang N., Matsuki A., Kamiya Y., Toriba A. and Hayakawa K., "Mineral dust aerosols promote the formation of toxic nitropolycyclic aromatic compounds," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 24427, 2016.
- Kamiya M., Toriba A., Onoda Y., Kizu R., Hayakawa K., "Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 43, p. 1017–1027, 2005.
- Karavalakis G., Deves G., Fontaras G., Stournas S., Samaras Z. and Bakeas E., "The impact of soy-based biodiesel on PAH, nitro-PAH and oxy-PAH emissions from a passenger car operated over regulated and nonregulated driving cycles," *Fuel*, vol. 89, p. 3876-3883, 2010.
- Kavouras I., Koutrakis P., Tzapakis M., Lagoudaki E., Stephanou E., Von Baer D. and Oyola P., "Source apportionment of urban particulate aliphatic and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) using

- 1 multivariate methods," *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 2288–2294, 2001.
- 2 Kawanishi M., Fujikawa Y., Ishii H., Nishida H., Igashigaki Y. H., Kanno T. M., Takamura-Enyac T. and
3 Yagi T., "Adduct formation and repair, and translesion DNA synthesis across the adducts in human
4 cells exposed to 3-nitrobenzanthrone," *Mutation Research*, vol. 753, p. 93–100, 2013.
- 5 Keyte I., Harrison R. and Lammel G., "Chemical reactivity and long-range transport potential of
6 polycyclic aromatic hydrocarbons—a review," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, p. 9333–9391, 2013.
- 7 Keyte I.J., Albinet A. and Harrison R.M., "On-road traffic emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons
8 and their oxy- and nitro-derivative compounds measured in road tunnel environments" *Sci. Total
9 Environ.*, vol. 566, p. 1131–1142, 2016.
- 10 Kim K.H., Woo D., Lee S.B. and Bae G.N., "On-Road Measurements of Ultrafine Particles and
11 Associated Air Pollutants in a Densely Populated Area of Seoul, Korea," *Aerosol and Air Quality
12 Research*, vol. 15: 142–153, 2015.
- 13 Kim Y., Ko Y., Kawamoto T. and Kim H., "The effects of 1-nitropyrene on oxidative DNA damage and
14 expression of DNA repair enzymes," *J. Occup. Health*, vol. 47, p. 261–266, 2005.
- 15 King L., Kohan M., Brooks L., Nelson G., Ross J., Allison J., Adams L., Desai D., Amin S., Padgett W.,
16 Lambert G., Richard A. and Nesnow S., "An evaluation of the mutagenicity, metabolism, and DNA
17 adduct formation of 5-nitrobenzo[*b*]naphtho[2,1-*d*]thiophene," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 14, p.
18 661–671, 2001.
- 19 Kishikawa N., Morita S., Wada M., Ohba Y., Nakashima K. and Kuroda N., "Determination of
20 hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates by high-performance liquid
21 chromatography with fluorescence detection," *Anal. Sci.*, vol. 20, p. 129–132, 2004.
- 22 Knecht A. L., Goodale B. C., Truong L., Simonich M. T., Swanson A. J., Matzke M. M., Anderson K. A.,
23 Waters K. M. and Tanguay R. L., "Comparative developmental toxicity of environmentally relevant
24 oxygenated PAHs," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 271, p. 266–275, 2013.
- 25 Kochany J., Maguire R.J., "Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and
26 polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments.," *Sci Total Environ.*, vol. 144,
27 p. 17–31, 1994.
- 28 Koike E., Yanagisawa R. and Takano H., "Toxicological effects of polycyclic aromatic hydrocarbons
29 and their derivatives on respiratory cells," *Atmospheric Environment*, vol. 97, p. 529–536, 2014.
- 30 Kojima Y., Inazu K., Hisamatsu Y., Okochi H., Baba T. and Nagoya T., "Comparison of PAHs, nitro-
31 PAHs and oxy-PAHs associated with airborne particulate matter at roadside and urban background
32 sites in downtown Tokyo, Japan," *Polycycl. Aromat. Compd.*, vol. 30, p. 321–333, 2010 a.
- 33 Kong S., Ding X., Bai Z., Han B., Chen L., Shi J. and Li Z., "A seasonal study of polycyclic aromatic
34 hydrocarbons in PM_{2.5} and PM_{2.5–10} in five typical cities of Liaoning Province" *China. J. Hazard.
35 Mater.*, vol. 183, p. 70–80, 2010.
- 36 Kooter I. M., Alblas M. J., Jedynska A. D., Steenhof M., Houtzager M. M. and Van Ras M., "Alveolar
37 epithelial cells (A549) exposed at the air–liquid interface to diesel exhaust: First study in TNO's
38 powertrain test center," *Toxicology in Vitro*, vol. 27, p. 2342–2349, 2013.
- 39 Krugly E., Martuzevicius D., Sidaraviciute R., Ciuzas D., Prasauskas T., Kauneliene V., Stasiulaitiene I.,
40 Kliucininkas L., "Characterization of particulate and vapor phase polycyclic aromatic hydrocarbons
41 in indoor and outdoor air of primary schools," *Atmos. Environ.*, Vol. 82, p. 298–306., 2014.
- 42 Kuo C.Y., Chien P.S., Kuo W.C., Wei C.T. and Rau J.Y., "Comparison of polycyclic aromatic
43 hydrocarbon emissions on gasoline- and diesel-dominated routes," *Environ Monit Assess.*, vol.
44 185(7), p. 5749–5761, 2012.
- 45 Laali K., Chun J.-H., Okazaki T., Kumar S., Borosky G. and Swartz C., "Electrophilic chemistry of thia-
46 PAHs: stable carbocations (NMR and DFT), S-alkylated onium salts, model electrophilic
47 substitutions (nitration and bromination), and muta- genicity assay," *J. Org. Chem.*, vol. 72, p.
48 8383–8393, 2007.
- 49 Ladji R., Yassaa N., Balducci C., Cecinato A. and Meklati B.Y., "Annual variation of particulate organic
50 compounds in PM₁₀ in the urban atmosphere of Algiers." *Atmos. Res.*, vol. 92, p. 258–269, 2009.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Lafontaine S., Schrlau J., Butler J., Jia Y., Harper B., Harris S., Bramer L.M., Waters K.M. Harding, A.
2 and Simonich S.L.M., "Relative influence of trans-pacific and regional at- mospheric transport of
3 PAHs in the Pacific Northwest " *US. Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, p.13807–13816, 2015.
- 4 Lai Y.C., Tsai C.H., Chen Y.L. and Chang-Chien G.P., "Distribution and Sources of Atmospheric
5 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at an Industrial Region in Kaohsiung, Taiwan, " *Aerosol and*
6 *Air Quality Research*, vol. 17, p.776–787, 2017.
- 7
8 Lamy E., Kassie F., Gminski R., Schmeiser H. and Mersch-Sundermann V., "3-Nitrobenzanthrone (3-
9 NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells,"
10 *Toxicol. Lett.*, vol. 146, p. 103–109, 2004.
- 11
12 Landkocz Y., Ledoux F., Andre V., Cazier F., Genevray P., Dewaele D., Martin P. J., Lepers C., Verdin
13 A., Courcot L., Boushina S., Sichel F., Gualtieri M., Shirali P., Courcot D. and Billet S., "Fine and
14 ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical
15 characterization, mutagenicity and cytotoxicity," *Environmental Pollution*, vol. 221, p. 130-140,
16 2017.
- 17
18 Landvik N. E., Gorria M., Arlt V. M., Asare N., Solhaug A., Lagadic-Gossmann D. and Holme J. A.,
19 "Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell
20 signalling related to apoptosis: Possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects,"
21 *Toxicology*, vol. 231, p. 159–174 , 2007.
- 22
23 Latif I., Karim A., Zuki A., Zamri-Saad M. and Niu J. N. M., "Pulmonary modulation of benzo[a]pyrene-
24 induced hemato- and hepatotoxicity in broilers.," *Poult. Sci.*, vol. 89(7), p. 1379–1388, 2010.
- 25
26 Laumbach R., Tong J., Zhang L., Ohman-Strickland P., Stern A., Fiedler N., Kipen H., Kelly-McNeil K.,
27 Lioy P. and Zhang J., "Quantification of 1-aminopyrene in human urine after a controlled exposure
28 to diesel exhaust," *J Environ Monit.*, vol. 11(1), p. 153–159, 2009 .
- 29
30 Layshock J., Wilson G. and Anderson K., "Ketone and quinone-substituted polycyclic aromatic
31 hydrocarbons in mussel tissue, sediment, urban dust, and diesel particulate matrices," *Environ.*
32 *Toxicol. Chem.*, vol. 29, p. 2450–2460, 2010.
- 33
34 Leclercq B., Allemana L.Y., Perdrix E., Riffault V., Happillon M., Strecker A., Lo-Guidice J.M, Garçon
35 G. and Coddeville P., "Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture
36 media: Toxicological perspectives, " *Environmental Research*, vol.156, p. 148–157, 2017.
- 37
38 Leclercq B., Happillon M., Antherieu S., Hardy E., Alleman L., Grova N., Perdrix E., Appenzeller B., Lo
39 Guidice J.M., Coddeville P. and Garçon G., "Differential responses of healthy and chronic
40 obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air
41 pollution-derived PM4," *Environmental Pollution*, vol. 218, p. 1074-1088, 2016.
- 42
43 Lee H. H., Choi N. R., Lim H. B., Yi S. M., Kim Y. P. and Lee J. Y., "Characteristics of oxygenated
44 PAHs in PM₁₀ at Seoul, Korea," vol. xxx, p. 1-7, 2017.
- 45
46 Lee S., Ho K. F., L. Y. Chan, Zielinska B., Chow J.C. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and
47 carbonyl compounds in urban atmosphere of Hong Kong," *Atmos Environ*, vol. 35, p. 5949- 5960,
48 2001.
- 49
50 Leskinen J., Tissari J., Uski O., Virén A., Torvela T., Kaivosoja T., Lamberg H., Nuutinen I., Kettunen
51 T., Joutsensaari J., Jalava P., Sippula O., Hirvonen M. and Jokiniemi J., "Fine particle emissions in
52 three different combustion conditions of a wood chip-fired appliance - particulate physico-chemical
53 properties and induced cell death," *Atmos. Environ.*, vol. 86, p. 129–139, 2014.
- 54
55 Levesque S., Surace M., McDonald J. and Block M., "Air pollution and the brain: subchronic diesel
56 exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative
57 disease.," *J. Neuroinflamm.*, vol. 8, p. 105, 2011.
- 58
59 Li M., Wang T.-G., Simoneit B. R., Shi S., Zhang L. and Yang F., "Qualitative and quantitative analysis
60 of dibenzothiophene, its methylated homologues, and benzonaphthothiophenes in crude oils, coal,
61 and sediment extracts," *Journal of Chromatography A*, vol. 1233, p. 126–136, 2012.
- 62
63 Li W., Wang C., Shen H., Su S., Shen G., Huang Y., Zhang Y., Chen Y., Chen H., Lin N., Zhuo S.,
64 Zhong Q., Wang X., Liu J., Li B., Liu W. and Tao S., "Concentrations and origins of nitro-
65

- 1 polycyclic aromatic hydrocarbons and oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in
2 urban and rural areas in northern China", *Environ. Pollut.*, vol. 197, p. 156–164, 2015.
- 3 Lia R., Zhao L., Zhang L., Chen M., Dong C. and Cai Z., "DNA damage and repair, oxidative stress
4 and metabolism biomarker responses in lungs of rats exposed to ambient atmospheric 1-
5 nitropyrene," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 54, p. 14–20, 2017.
- 6 Liang F., Lu M., Birch M. E., Keener T. C. and Liu Z., "Determination of polycyclic aromatic sulfur
7 heterocycles in diesel particulate matter and diesel fuel by gas chromatography with atomic
8 emission detection," *Journal of Chromatography A*, vol. 1114, p. 145–153, 2006.
- 9 Lima A.L.C., Farrington J.W., Reddy C.M., "Combustion-derived polycyclic aromatic hydro- carbons in
10 the environment," *Rev Environ Forensic*, vol. 6 (2), p. 109-131, 2005.
- 11 Lin Y., Qiu X., Ma Y., Ma J., Zheng M. and Shao M., "Concentrations and spatial distribution of
12 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitrated PAHs (NPAHs) in the atmosphere of North
13 China, and the transformation from PAHs to NPAHs," *Environmental Pollution*, vol.196, p. 164-
14 170, 2015.
- 15 Liu L.B., Liu Y., Lin J.M., Tang N., Hayakawa K. and Maeda T., "Development of analytical methods for
16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review," *Journal of
17 Environmental Sciences*, vol. 19, p. 1–11, 2007.
- 18 Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N.,
19 Baan R., Mattock H. and Straif K., "The carcinogenicity of outdoor air pollution," *Lancet Oncol.*,
20 vol. 14, p. 1262–1263, 2013.
- 21 Lundstedt S., White P., Lemieux C., Lynes K., Lambert L., Oberg L., Haglund P. and Tysklind M.,
22 "Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-
23 contaminated sites.," *Ambio*, vol. 36, p. 475–485, 2007.
- 24 Lynch S.M. and Rebbeck T.R., "Bridging the gap between biologic, individual, and macro-environmental
25 factors in cancer: a multilevel approach.," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 22(4), p. 485–
26 495, 2013.
- 27 Maliszewska-Kordybach B., "Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic
28 Hydrocarbons (PAHs) in the Environment. Part A: PAHs in Air," *Polish Journal of Environmental
29 Studies*, vol. 8, no. 3, p. 131-136, 1999.
- 30 Mandalakis M., Tsapakis M., Tsoga A. and Stephanou E., " Gas-particle concentrations and distribution
31 of aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and PCDD/Fs in the atmosphere of Athens (Greece),"
32 *Atmospheric Environment*, vol. 36, p. 4023–4035, 2002.
- 33 Manoli E., Voutsas D. and Samara C., "Chemical characterization and source identifica-
34 tion/apportionment of fine and coarse air particles in Thessaloniki, Greece," *Atmos. Environ.*, vol.
35 36, p. 949–961, 2002.
- 36 Maria J. and Segner H., "Antiestrogenicity of b-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout
37 hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor," *Aquat. Toxicol.*, vol. 51, p. 79–
38 92, 2000.
- 39 Marino F., Cecinato A. and Siskos P.A., "Nitro-PAH in ambient particulate matter in the atmosphere of
40 Athens," *Chemosphere*, vol. 40, p. 533-537, 2000.
- 41 Mastral A. M., Callen M. and Murillo R., "Assessment of PAH emissions as a function of coal
42 combustion variables," *Fuel*, vol. 75 (13), p. 1533- 1536, 1996.
- 43 Mcclean M., Rinehart R., Ngo L. and Eisen E., "Urinary 1-hydroxypyrene and polycyclic aromatic
44 hydrocarbon exposure among asphalt paving workers," vol. 48(6), p. 565–578, 2004.
- 45 McDougal A., Wormke M., Calvin J. and Safe S., "Tamoxifen- induced antitumorigenic/antiestrogenic
46 action synergized by a selective aryl hydrocarbon receptor modulator," *Cancer Res.*, vol. 61, p.
47 3902–3907, 2001.
- 48 McFall T., Booth G., Lee M., Tominaga Y., Pratap R., Tedjamulia M. and Castle R., "Mutagenic activity
49 of methyl-substituted tri- and tetracyclic aromatic sulfur heterocycles," *Mutat. Res*, vol. 135, p. 97–
50 103, 1984.
- 51 Miet K., Le Menach K., Flaud P. M., Budzinski H. and Villenave E., "Heterogeneous reactions of ozone
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 with pyrene1-hydroxypyrene and 1-nitropyrene adsorbed on particles," *Atmos. Environ.*, vol. 43, p.
2 3699–3707, 2009a.
- 3 Miet K., Le Menach K., Flaud P., Budzinski H. and Villenave E., "Heterogeneous reactions of ozone with
4 pyrene, 1-hydroxypyrene and 1-nitropyrene adsorbed on particles," *Atmospheric Environment*, vol.
5 43, p. 3699-3707, 2009b.
- 6 Miller-Schulze J. P., Paulsen M., Kameda T., Toriba A., Hayakawa K., Cassidy B., Naeher L., Villalobos
7 M. A. and C. D. Simpson, "Nitro-PAH exposures of occupationally-exposed traffic workers and
8 associated urinary 1-nitropyrene metabolite concentrations," *Journal of Environmental Sciences*,
9 vol. 49, p. 213–221, 2016.
- 10 Miller-Schulze J., Kameda T., Toriba A., Tang N., Tamura K., Dong L., Zhang X., Hayakawa K., Yost
11 M. and Simpson C., "Evaluation of urinary metabolites of 1-nitropyrene as biomarkers for exposure
12 to diesel exhaust in taxi drivers of Shenyang, China.," *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, vol. 23(2), p.
13 170-5, 2013 .
- 14 Moorthy B., Chu C. and Carlin D. J., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung
15 Cancer," *Toxicological Sciences*, vol. 145(1), p. 5–15, 2015.
- 16 Mossner S. G., Lopez de Alda M. J., Sander L. C., Lee M. L. and Wise S. A., "Gas chromatographic
17 retention behavior of polycyclic aromatic sulfur heterocyclic compounds, (dibenzothiophene,
18 naphtho[*b*]thiophenes, benzo[*b*]naphthothiophenes and alkyl- substituted derivatives) on stationary
19 phases of different selectivity," *Journal of Chromatography A*, vol. 841, p. 207–228, 1999.
- 20 Nagy E., Johansson C., Zeisig M. and Moller L., "Oxidative stress and DNA damage caused by the urban
21 air pollutant 3-NBA and its isomer 2-NBA in human lung cells analyzed with three independent
22 methods," *J. Chromatogr. B*, vol. 827, p. 94–103., 2005.
- 23 Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A., Adachi S. and Moller L., "DNA-adduct and
24 tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-
25 nitrobenzanthrone," *Carcinogenesis* , vol. 26, p. 1821–1828, 2005.
- 26 Nalin F., Golly B., Besombes J.L., Pelletier C., Aujay R., Verlhac S., Dermigny A., Fievet A., Karoski
27 N., Dubois P., Collet S., Favez O. and Albinet A., "Fast oxidation processes from emission to
28 ambient air introduction of aerosol emitted by residential log wood stoves," *Atmos. Environ.*, vol.
29 143, p. 15-26, 2016.
- 30 Nebert D. and Dalton T., "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and
31 environmental carcinogenesis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, p. 947–960, 2006.
- 32 Nebert D., Dalton T., Okey A. and Gonzalez F., "Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction
33 of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer," *J. Biol. Chem.* , vol. 279, p. 23847–
34 23850, 2004.
- 35 Nemmar A., Al-Salam S., Zia S., Marzouqi F., Al-Dhaheri A., Subramaniyan D., Dhanasekaran S., Yasin
36 J., Ali B.H., Kazzam E.E., "Contrasting actions of diesel exhaust particles on the pulmonary and
37 cardiovascular systems and the effects of thymoquinone.," *Br. J. Pharmacol.* , vol. 164, p. 1871–
38 1882, 2011.
- 39 Neophytou A. M., Hart J. E., Chang Y., Zhang J., Smith T. J., Garshick E. and Laden F., "Short-term
40 traffic related exposures and biomarkers of nitro- PAH exposure and oxidative DNA damage,"
41 *Toxics.*, vol. 2(3), p. 377–390, 2014.
- 42 Neophytou A., Hart J., Cavallari J., Smith T., Dockery D., Coull B., Garshick E. and Laden F., "Traffic-
43 related exposures and biomarkers of systemic inflammation, endothelial activation and oxidative
44 stress: a panel study in the US trucking industry," *Environ. Health*, vol. 12, p. 105-115, 2013.
- 45 Niu X., Hang Ho S. S., Ho K. F., Huang Y., Sun J., Wang Q., Zhou Y., Zhao Z. and Cao J., "Atmospheric
46 levels and cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated-PAHs in PM_{2.5} in the
47 Beijing-Tianjin- Hebei region," *Environmental Pollution*, vol. 231, p. 1075-1084, 2017.
- 48 O'Connell S. G., Haigh T., Wilson G. and Anderson K. A., "An analytical investigation of 24
49 oxygenated-PAHs (OPAHs) using liquid and gas chromatography–mass spectrometry," *Anal
50 Bioanal Chem*, vol. 405, p. 8885–8896, 2013.
- 51 Oda J., Nomura S., Yasuhara A. and Shibamoto T., "Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic
52 hydrocarbons in the Tokyo metropolitan area," *Chemosphere*, vol. 50, p. 1031–1040, 2005.

- 1 hydrocarbons in a roadway tunnel," *Atmospheric Environment*, vol. 35, p. 4819–4827, 2001.
- 2 Oliveira C., Martins N., Tavares J., Pio C., Cerqueira M., Matos M., Silva H., Oliveira C. and Camoes F.,
3 "Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in a roadway tunnel in Lisbon, Portugal,"
4 *Chemospheres*, vol. 83, p. 1588–1596, 2011.
- 5 Olsson A., Fevotte J. F. T., Cassidy A., Mannetje A., Zaridze D., Szeszenia-Dabrowska N., Rudnai P.,
6 Lissowska J., Fabianova E., Mates D., Bencko V., Foretova L., Janout V., Brennan P. and Boffetta
7 P., "Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk: a multicenter
8 study in Europe," *Occup Environ Med*, vol. 67, p. 98–103, 2010.
- 9 Onduka T., Ojima D., Ito K., Mochida K., Koyoma J., and Fujii K., "Reproductive toxicity of 1-
10 nitronaphthalene and 1-nitropyrene exposure in the mummichog, *Fundus heteroclitus*,"
11 *Ecotoxicology*, vol. 24, p. 648–656, 2015.
- 12 Ovrevik J., Arlt V.M., Oya E., Nagy E., Mollerup S., Phillips D.H., Lag M. and Holme J.A., "Differential
13 effects of nitro-PAHs and amino-PAHs on cytokine and chemokine responses in human bronchial
14 epithelial BEAS-2B cells", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 242, p. 270–280, 2010.
- 15 Oya E., Ovrevik J., Arlt V. M., Nagy E., Phillips D. H. and Holme A., "DNA damage and DNA damage
16 response in human bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure to 2-nitrobenzanthrone
17 and 3-nitrobenzanthrone: role in apoptosis," *Mutagenesis*, vol. 26(6), p. 697–708, 2011.
- 18 Park E. and Park K., "Induction of pro-inflammatory signals by 1-nitropyrene in cultured BEAS-2B
19 cells," *Toxicol. Lett.*, vol. 184, p. 126–133, 2009.
- 20 Park S., Kim Y. and Kang C., "Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea,"
21 *Atmospheric Environment*, vol. 36, p. 2917–2924, 2002.
- 22 Park S.S., Bae M.-S., Schauer J.J., Kim Y.J., Cho S.Y. and Kim S.J., "Molecular composition of PM_{2.5}
23 organic aerosol measured at an urban site of Korea during the ACE-Asia campaign," *Atmos.*
24 *Environ.*, vol. 40, p. 4182-4198, 2006.
- 25 Paturel L., Saber A., Combet E. and Joumard R., "Analysis of PAH emissions from passenger cars by
26 high resolution Shpol'skii spectrofluorimetry," *Polycyclic Aromatic Compounds*, vol. 9, p. 331–
27 339, 1996.
- 28 Pederson T. and Siak J., "The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel
29 particle extracts," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 1, p. 54–60., 1981.
- 30 Pelroy R., Stewart D., Tominaga Y., Iwao M., Castle R. and Lee M., "Microbial mutagenicity of 3- and 4-
31 ring polycyclic aromatic sulfur heterocycles," *Mutat. Res.*, p. 31–40, 1983.
- 32 Perera F., Tang D., Whyatt R., Lederman S. and Jedrychowski W., "DNA damage from polycyclic
33 aromatic hydrocarbons measured by benzo[*a*]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from
34 Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China," *Cancer Epidemiol*
35 *Biomarkers Prev.*, vol. 14(3), p. 709–714, 2005.
- 36 Perera F.P., Wang S., Vishnevetsky J., Zhang B., Cole K. J., Tang D., Rauh V., Phillips D.H. "Polycyclic
37 aromatic hydrocarbons-aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York city
38 children," *Environ Health Perspect*, vol. 119(8), p. 1176–1181, 2011.
- 39 Phouongphouang P., Grosovsky A., Eastmond D., Covarrubias M. and Arey J., "The genotoxicity of 3-
40 nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts," *Mutat. Res.*, vol. 472, p.
41 93–103, 2000.
- 42 Pluquet O. and Hainaut P., "Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction," *Cancer Lett.*, vol.
43 174, p. 1–15, 2001.
- 44 Pope III C., Burnett R., Thun M., Calle E., Krewski D., Ito K. and Thurston G., "Lung cancer,
45 cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution," *JAMA*, vol.
46 287, p. 1132–1141, 2002.
- 47 Purohit V. and Basu A., "Mutagenicity of nitroaromatic compounds," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 13, p.
48 673–692, 2000.
- 49 Ramirez N., Cuadras A., Rovira E., Marce R.M. and Borrull F., "Risk assessment related to atmospheric
50 polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particle phases near industrial sites," *Environ. Health*
51 *Perspect.*, vol. 119, p. 1110–1116, 2011.

- 1 Ravindra K., Bencs L., Wauters E., De Hoog J., Deutsch F., Roekens E., Bleux N., Bergmans P. and Van
2 Grieken R., "Seasonal and site specific variation in vapor and aerosol phase PAHs over Flanders
3 (Belgium) and their relation with anthropogenic activities," *Atmospheric Environment*, vol. 40, p.
4 771-785, 2006 a.
- 5 Ravindra K., Sokhia R. and Grieken R. V., "Review : Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons:
6 Source attribution, emission factors and regulation," *Atmospheric Environment*, vol. 42, p. 2895–
7 2921, 2008.
- 8 Ravindra K., Wauters E., Taygi S., Mor S. and Van Grieken R., "Assessment of air quality after the
9 implementation of CNG as fuel in public transport in Delhi, India.," *Environmental Monitoring and
10 Assessment*, vol. 115, p. 405–417, 2006 b.
- 11 Reisen F. and Arey J., "Atmospheric reactions influence seasonal PAH and nitro-PAH concentrations in
12 the Los Angeles basin," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 64–73, 2005.
- 13 Ren A., Qiu X., Jin L., Ma J., Li Z., Zhang L., Zhuc H., Finnell R. and Zhub T., "Association of selected
14 persistent organic pollutants in the placenta with the risk of neural tube defects.," *Proc. Nat. Acad.
15 Sci. USA*, vol. 108(31), p. 12770–12775, 2011.
- 16 Ren H., Kawagoe T., Jia H., Endo H., Kitazawa A., Goto S. and Hayashi T., "Continuous surface
17 seawater surveillance on poly aromatic hydrocarbons (PAHs) and mutagenicity of East and South
18 China Seas.," *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, vol. 86, p. 395–400, 2010.
- 19 Ren Y., Zhou B., Tao J., Cao J., Zhang Z., Wu C., Wang J., Li J., Zhang L., Han Y., Liu L., Cao C. and
20 Wang G., "Composition and size distribution of airborne particulate PAHs and oxygenated PAHs in
21 two Chinese megacities," *Atmospheric Research*, vol. 183, p. 322–330, 2017.
- 22 Ringuet J., Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H. and Villenave E., "Diurnal/nocturnal
23 concentrations and sources of particulate-bound PAHs, OPAHs and NPAHs at traffic and suburban
24 sites in the region of Paris (France)," *Science of the Total Environment*, vol. 437, p. 297–305, 2012.
- 25 Sanderson E. and Farant J., "Atmospheric size distribution of PAHs: evidence of a high-volume sampling
26 artifact.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 7631–7637, 2005.
- 27 Sarti E., Pasti L., Scaroni I., Casali P., Cavazzini A. and Rossi M., "Determination of n- alkanes, PAHs
28 and nitro-PAHs in PM_{2.5} and PM₁ sampled in the surroundings of a municipal waste incinerator,"
29 *Atmos. Environ.*, vol. 149, p. 12–23, 2017.
- 30 Scipioni C., Villanueva F., Pozo K. and Mabilia R., "Preliminary characterization of polycyclic aromatic
31 hydrocarbons, nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-p-dioxins
32 and furans in atmospheric PM₁₀ of an urban and a remote area of Chile, " *Environ. Technol.*, vol.
33 33, p. 809–820, 2012.
- 34 Shen G., Wang W., Yang Y., Ding J., Xue M., Min Y., Zhu C., Shen H., Li W., Wang B., Wang R.,
35 Wang X., Tao S. and Russell A., "Emissions of PAHs from indoor crop residue burning in a typical
36 rural stove: emission factors, size distributions, and gas-particle partitioning. *Environ.*" *Sci.
37 Technol.*, vol. 45, p. 1206–1212, 2011.
- 38 Shen G., Wang W., Yang Y., Zhu C., Min Y., Xue M., Ding J., Li W., Wang B., Shen H., Wang R.,
39 Wang X. and Tao S., "Emission factors and particulate matter size distribution of polycyclic
40 aromatic hydrocarbons from residential coal combustions in rural northern China," *Atmos. Environ.*,
41 vol. 44, p. 5237–5243, 2010.
- 42 Sheu C. W., Dobras S. N., Rodriguez I., LEE J.K. and FU P. P., "Transforming activity of selected
43 polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives in BALB/3T3 A31-1-1 cells, " *Fd
44 Chem. Toxic.*, vol. 32(7), p. 611-615, 1994.
- 45 Shi S. and Zhao B., "Comparison of the predicted concentration of outdoor originated indoor polycyclic
46 aromatic hydrocarbons between a kinetic partition model and a linear instantaneous model for gas–
47 particle partition," *Atmospheric Environment*, vol. 59, p. 93-101., 2012.
- 48 Shimada T. and Fujii-Kuriyama Y., "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to
49 carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1," *Cancer Sci.*, vol. 95(1), p. 1–6, 2004.
- 50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Shuzhen L., Tao S., Liu W., Liu Y., Dou H., Zhao J., Wang L. W. J., Tian Z. and Gao Y., "Atmospheric
2 polycyclic aromatic hydrocarbons in North China: a wintertime study," *Environ Sci Technol*, vol.
3 41, p. 8256–8261, 2007.
- 4 Siegmund B., Weiss R. and Pfannhauser W., "Sensitive method for the determination of nitrated
5 polycyclic aromatic hydrocarbons in the human diet," *Anal Bioanal Chem*, vol. 375, p. 175-181,
6 2003.
- 8 Sienra M. R., "Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter,"
9 *Atmospheric Environment*, vol. 40, p. 2374–2384, 2006.
- 10 Simoneit B., Bi X., Oros D., Medeiros P., Sheng G. and Fu J., "Phenols and hydroxy-PAHs (arylphenols)
11 as tracers for coal smoke particulate matter: Source tests and ambient aerosol assessments,"
12 *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41 , p. 7294–7302., 2007.
- 14 Sklorz M., Briede J., Schnelle-Kreis J., Liu Y., Cyrus J., De Kok T. and Zimmermann R., "Concentration
15 of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygen free radical formation from urban
16 particulate matter," *J. Toxic. Environ. Health A*, vol. 70, p. 1866–1869, 2007.
- 18 Sobus J., McClean M., Herrick R.F, Waidyanatha S., Nylander-French L.A, Kupper L.L. and Rappaport
19 S.M., "Comparing urinary biomarkers of airborne and dermal exposure to polycyclic aromatic
20 compounds in asphalt-exposed workers," *Ann Occup Hyg*, vol. 53(6), p. 561–571, 2009.
- 22 Souza K. F., Carvalho L. R., Allen A. G. and Cardoso A. A., "Diurnal and nocturnal measurements of
23 PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH compounds in atmospheric particulate matter of a sugar cane
24 burning region," *Atmospheric Environment*, vol. 83, p. 193-201, 2014.
- 25 Stcha K. R., Staretz M. E., Wang M., Liang L., Kenney P. M. and Hecht S. S., "Effects of benzyl
26 isothiocyanate and phenethyl isothiocyanate on benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct
27 formation in the A/J mouse.," *Carcinogenesis*, vol. 21, p. 1711–1719, 2000.
- 29 Stroomborg G., Ariese F., Van Gestel C., Van Hattum B., Velthorst N. and Van Straalen N., "Pyrene
30 biotransformation products as biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in
31 terrestrial Isopoda: concentration-response relationship, and field study in a contaminated forest.,"
32 *Environ Toxicol. Chem.*, vol. 22(1), p. 224–231, 2003.
- 34 Swartz C. D., King L. C., Nesnow S., Umbach D. M., Kumard S. and DeMarini D. M., "Mutagenicity,
35 stable DNA adducts, and abasic sites induced in Salmonella by phenanthro[3,4-b]- and
36 phenanthro[4,3-b]thiophenes, sulfur analogs of benzo[c]phenanthrene," *Mutation Research*, vol.
37 661, p. 47–56, 2009.
- 39 Tang N., Hattori T., Taga R., Igarashi K., Yang X.Y., Tamura K., Kakimoto H., Mishukov V.F., Toriba
40 A., Kizu R. and Hayakawa K., "Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic
41 hydrocarbons in urban air particulates and their relationship to emission sources in the Pan-Japan
42 Sea countries," *Atmos. Environ.*, vol. 39, p. 5817–5826, 2015.
- 44 Teixeira E., Garcia K., Meincke L. and Leal K.A., "Study of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in
45 fine and coarse atmospheric particles," *Atmos. Res.*, vol. 101, p. 631–639, 2011.
- 46 Tokiwa H. and Ohnishi Y., "Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the
47 environment," *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 17, p. 23–60, 1986.
- 48 Tokiwa H., Nakagawa R., Morita K. and Ohnishi Y., "Mutagenicity of nitro derivatives induced by
49 exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide," *Mutation Res.*, vol. 85, p. 195-205, 1981a.
- 51 Tomaz S., Jaffrezou J.-L., Favez O., Perraudin E., Villenave E. and Albinet A., "Sources and atmospheric
52 chemistry of oxy- and nitro-PAHs in the ambient air of Grenoble (France)," *Atmospheric
53 Environment*, vol. 161, p. 144-154, 2017.
- 54 Topinka J., Schwarz L., Kiefer F., Wiebel F., Gajdgo O., Vidova P., Dobias L., Fried M., Sram R. and
55 Wolff T., "DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons
56 (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract," *Mutation Research*, vol. 419 , p. 91-105,
57 1998.
- 59 Toriba A., Kitaoka H., Dills R., Mizukami S., Tanabe K., Takeuchi N., Ueno M., Kameda T., Tang N.,
60 Hayakawa K. and Simpson C., "Identification and quantification of 1-nitropyrene metabolites in
61
62
63
64
65

- 1 human urine as a proposed biomarker for exposure to diesel exhaust.," *Chem. Res. Toxicol.* , vol.
2 20(7), p. 999–1007, 2007.
- 3 Travares J., Pinto J., Souza A. S. I. and Silci M., "Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from
4 diesel engine in a bus station, Londrina, Brazil.," *Atmos Environ* , vol. 38, p. 5039–5044, 2004.
- 5 Traversi D., Schiliro T., Degan R., Pignata C., Alessandria L., Gilli G., "Involvement of nitro-compounds
6 in the mutagenicity of urban $PM_{2.5}$ and PM_{10} in Turin", *Mutation Research*, vol. 726, p. 54–59,
7 2011.
- 8
9 Tsakas M.P., Sitaras I.E. and Siskos P.A., "Nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric
10 particulate matter of Athens, Greece, " *Chem. Ecol.*, vol. 26, p. 251–261, 2010.
- 11 U.S. Department of Health and Human Services Secretary Kathleen Sebelius, 12th Report on
12 Carcinogens (RoC), 2011.
- 13
14 Unwin J., Cocker J., Scobbie E. and Chambers H., "An assessment of occupational exposure to polycyclic
15 aromatic hydrocarbons in the UK.," *Ann Occup Hyg* , vol. 50(4), p. 395–403, 2006.
- 16 Valle-Hernandez B.L., Mugica-Alvarez V., Salinas-Talavera E., Amador-Munoz O., Murillo-Tovar M.A.,
17 Villalobos-Pietrini R. and De Vizcaya-Ruiz A., "Temporal varia- tion of nitro-polycyclic aromatic
18 hydrocarbons in PM_{10} and $PM_{2.5}$ collected in Northern Mexico City, " *Sci. Total Environ.*, vol. 408,
19 p. 5429–5438, 2010.
- 20
21 Van Drooge B.L., Fernandez P., Grimalt J.O., Stuchlik E., Garcia C.J.T. and Cuevas E., "Atmospheric
22 polycyclic aromatic hydrocarbons in remote European and Atlantic sites located above the
23 boundary mixing layer," *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 17, p. 1207-1216,
24 2010.
- 25
26 Varga C. and Szendi K., "In-vivo mutagenicity of the carcinogenic 1–nitropyrene: a model of a potential
27 asbestos exposure.," *Magy. Onkol.*, vol. 50, p. 337–340, 2006.
- 28
29 Vasconcellos P.D.C., Sanchez-Ccoyllo O., Balducci C., Mabilia R. and Cecinato A., "Occurrence and
30 concentration levels of nitro-PAH in the air of three Brazilian cities experiencing different emission
31 impacts, " *Water Air Soil Pollut.*, vol. 190, p. 87–94, 2008
- 32
33 Vestenius M., Leppänen S., Anttila P., Kyllönen K., J. Hatakka, H. Hellén, A. P. Hyvärinen and H.
34 Hakola, "Background concentrations and source apportionment of 109 polycyclic aromatic
35 hydrocarbons in south-eastern Finland," *Atmospheric Environment*, vol. 45, no. 20, p. 3391-3399,
36 2011.
- 37
38 Vicente E. and Alves C., "An overview of particulate emissions from residential biomass combustion,"
39 *Atmospheric Research*, vol. 199 , p. 159–185, 2018.
- 40
41 Vicente E., Vicente A., Bandowe B. M. and Alves C., "Particulate phase emission of parent polycyclic
42 aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (alkyl-PAHs, oxygenated-PAHs, azaarenes and
43 nitrated PAHs) from manually and automatically fired combustion appliances," *Air Qual. Atmos.*
44 *Health*, vol. 9, p. 653–668, 2016.
- 45
46 Vineis P., Forastiere F., Hoek G. and Lipsett M., "Outdoor air pollution and lung cancer: recent
47 epidemiologic evidence," *Int. J. Cancer*, vol. 111, p. 647–652, 2004.
- 48
49 Vione D., Barra S., De Gennaro G., De Rienzo M., Gillardoni S., Perrone M. and Pozzoli L., "Ann. Chim.
50 (Rome)," *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere: monitoring, sources, sinks and fate*,
51 vol. 94, p. 257–268, 2004.
- 52
53 Wada M., Kido H., Kishikawa N., Tou T., Tanaka M., Tsubokura J., Shironita M., Matsui M., Kuroda N.
54 and Nakashima K., "Assessment of air pollution in Nagasaki city: Determination of polycyclic
55 aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives, and some metals," *Environ. Pollut.*, vol. 115,
56 p. 139-147, 2001.
- 57
58 Walgraeve C., Demeestere K., Dewulf J., Zimmermann R. and Langenhove H. V., "Oxygenated
59 polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and
60 occurrence," *Atmospheric Environment* , vol. 44 , p. 1831-1846, 2010.
- 61
62
63
64
65

- 1 Wang C., Yang J., Zhu L., Yan L., Lu D., Zhang Q., Zhao M. and Li Z., "Never deem lightly the "less
2 harmful" low-molecular-weight PAH, NPAH, and OPAH d Disturbance of the immune response at
3 real environmental levels," *Chemosphere*, vol. 168 , p. 568-577, 2017.
- 4 Wang G., Kawamura K., Zhao X., Dai L. and Niu Z., "Identification, abundance and seasonal variation of
5 anthropogenic organic aerosols from a mega-city in China," *Atmos. Environ.*, vol. 41 , p. 407-416,
6 2007.
- 7
8 Wang J., Xu H., Guinot B., Li L., Ho S. H. S., Li X. and Cao J., "Concentrations, sources and health
9 effects of parent, oxygenated- and nitrated- polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in middle-
10 school air in Xi'an, China," *Atmospheric Research*, vol. 192 , p. 1-10, 2017.
- 11 Wang L.R., Wang Y., Chen J.-W. and Guo L.H., "A structure-based investigation on the binding
12 interaction of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA," *Toxicology*, vol. 262,
13 (3), p. 250-257, 2009.
- 14
15 Wang W., Huang M. J., Chan C., Cheung K. and Wong M., " Risk assessment of non-dietary exposure to
16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) via house PM_{2.5}, TSP and dust and the implications from
17 human hair.," vol. 73, p. 204-213, 2013.
- 18
19 Wang W., Jariyasopit N., Schrlau J., Jia Y., Tao S., Yu T.W., Dashwood R., Zhang W., Wang X. and
20 Simonich S., "Concentration and photochemistry of PAHs, NPAHs, and OPAHs and toxicity of
21 PM_{2.5} during the Beijing Olympic Games.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 6887-6895, 2011.
- 22
23 Wang W., Jing L., Zhan J., Wang B., Zhang D., Zhang H., Wang D., Yang Y., Zhao J., Sun Y., Bi X.,
24 Wang X. and Feng J., "Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon pollution during the Shanghai
25 World Expo 2010," *Atmos. Environ.*, vol. 89, p. 242-248, 2014.
- 26
27 Wang X., Thai P., Li Y., Li Q., Wainwright D., Hawker D. and Mueller J., "Changes in atmospheric
28 concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls between the
29 1990s and 2010s in an Australian city and the role of bushfires as a source," *Environ. Pollut.*, vol.
30 213, p. 223-231, 2016 a.
- 31
32 Wang Z., Ren P., Sun Y., Ma X., Liu X., Na G. and Yao Z., "Gas/particle partitioning of polycyclic
33 aromatic hydrocarbons in coastal atmosphere of the north Yellow Sea, China," *Environmental
34 Science and Pollution Research* , vol. 20 (8), p. 5753-5763, 2013.
- 35
36 Watt D., Utzat C., Hilario P. and Basu A., "Mutagenicity of the 1-nitropyrene- DNA adduct N-
37 (deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene in mammalian cells," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 20, p. 1658-
38 1664, 2007.
- 39
40 Wei C., Bandowe B. M., Han Y., Cao J., Zhan C. and Wilcke W., "Polycyclic aromatic hydrocarbons
41 (PAHs) and their derivatives (alkyl-PAHs, oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in
42 urban road dusts from Xi'an, Central China," *Chemosphere*, vol. 134, p. 512-520, 2015.
- 43
44 Wei S., Huang B., Liu M., Bi X., Ren Z., Sheng G. and Fu J., "Characterization of PM_{2.5}-bound nitrated
45 and oxygenated PAHs in two industrial sites of South China," *Atmospheric Research*, vol. 109-110,
46 p. 76-83, 2012.
- 47
48 Wei W., Zhang C., Liu A., Xie S., Chen X. and Lu W., " PCB126 enhanced the genotoxicity of B[a]P in
49 HepG2 cells bymodulating metabolic enzyme and DNA repair activities," *Toxicol. Lett.*, vol. 189, p.
50 91-95, 2009.
- 51
52 Wells P., McCallum G., Lam K., Henderson J. and Ondovcik S., "Oxidative DNA damage and repair in
53 teratogenesis and neurodevelopmental deficits.," *Birth Defects Res C Embryo Today* , vol. 90(2), p.
54 103-109, 2010.
- 55
56 West R. W. and Rowland K. L., "In-vitro transformation potential of N-Polycyclic Aromatic
57 Hydrocarbons in rat tracheal eothelial cells," *Toxic. in Vitro*, vol. 8(2), p. 301-307, 1994.
- 58
59 Wilson N.K., McCurd T.R. and Chuang J.C., "Concentrations and phase distributions of nitrated and
60 oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in ambient air, " *Atmospheric Environment*, vol.
61 29(19), p. 2575-2584, 1995.
- 62
63 Wislocki P. G., Bagan E., Lu Y. H., Dooley K. L., Fu P. P., Han-Hsu H., Beland F. A. and Kadlubar F. F.,
64 "Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene and benzo[a]
65 pyrene in the newborn mouse assay," *Carcinogenesis* , vol. 7, p. 1317-1322, 1986.

- 1 Yin S., Tang M., Chen F., Li T., and Liu W., "Environmental exposure to polycyclic aromatic
2 hydrocarbons (PAHs): The correlation with and impact on reproductive hormones in umbilical cord
3 serum," *Environmental Pollution*, vol. 220, p. 1429-1437, 2017.
- 4 Yu H., "Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and
5 phototoxicity.," *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental*
6 *Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, vol. 20, p. 149-183, 2002.
- 7 Yuan Y., Jin L., Wan L., Li Z., Zhang L., Zhu H., Finnell R. H., Zhou G. and Ren A., "Levels of PAH-
8 DNA adducts in placental tissue and the risk of fetal neural tube defects in a Chinese population,"
9 *Reprod. Toxicol.* , vol. 37, p. 70–75, 2013.
- 10 Yunker M., Macdonal R., Vingarzan R., Mitchell R., Goyette D. and Sylvestre S., "PAHs in the Fraser
11 River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition," *Org.*
12 *Geochem.*, vol. 33, p. 489–515, 2002.
- 13 Zaciera M., Kurek J., Dzwonek L., Feist B. and Jedrzejczak A., "Seasonal variability of PAHs and nitro-
14 PAHs concentrations in total suspended particulate matter in ambi-ent air of cities in Silesian
15 Voivodeship," *Environ. Prot. Eng.*, vol. 38, p. 45–50, 2012.
- 16 Zajda K., Ptak A., Rak A., Fiedor E., Grochowalski A., Milewicz T., and Gregoraszczyk E.L., "Effects of
17 human blood levels of two PAH mixtures on the AHR signalling activation pathway and CYP1A1
18 and COMT target genes in granulosa non- tumor and granulosa tumor cell lines, " *Toxicology*, vol.
19 389, p. 1–12, 2017.
- 20 Zhang J., Yang L., Mellouki A., Chen J., Chen X., Gao Y., Jiang P., Li Y., Yu H. and Wang W.,
21 "Atmospheric PAHs, NPAHs, and OPAHs at an urban, mountainous, and marine sites in Northern
22 China: Molecular composition, sources, and ageing, " *Atmospheric Environment*, *in press*, 2018.
- 23 Zhang Y. and Tao S., "Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons
24 (PAHs) for 2004," *Atmos. Environ.*, vol. 43, p. 812–819., 2009.
- 25 Zhang Y., Yang B., Gan J., Liu C., Shu X. and Shu J., " Nitration of particle- associated PAHs and their
26 derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals," *Atmos. Environ.*, vol. 45, p.
27 2515–2521, 2011.
- 28 Zhang Z., Xu S. C. and Wang Y., "The concentration and distribution of some organic matter in the
29 aerosol of Qingdao coast," *Periodical of Ocean university of China*, vol. 35, p. 661- 664, 2005.
- 30 Zhou C., Zhu X., Wang Z., Ma X., Chen J., Ni Y., Wang W., Mu J., Li X. Gas - Particle Partitioning of
31 PAHs In the Urban Air of Dalian, China: Measurements and Assessments." *Polycyclic Aromatic*
32 *Compounds*, vol 33(11), p. 31 – 51, 2013
- 33 Zhu L., Lu H., Chen S. and Amagai T., "Pollution level, phase distribution and source analysis of
34 polycyclic aromatic hydrocarbons in residential air in Hangzhou, China.," *J. Hazard Mater*, vol.
35 162(2–3), p. 1165-1170, 2009.
- 36 Zimmermann K., Jariyasopit N., Simonich S., Tao S., Atkinson R. and Arey J., "Formation of nitro-PAHs
37 from the heterogeneous reaction of ambient particle-bound PAHs with N₂O₅/NO₃/NO₂," *Environ.*
38 *Sci. Technol.*, vol. 47, p. 8434–8442, 2013.
- 39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

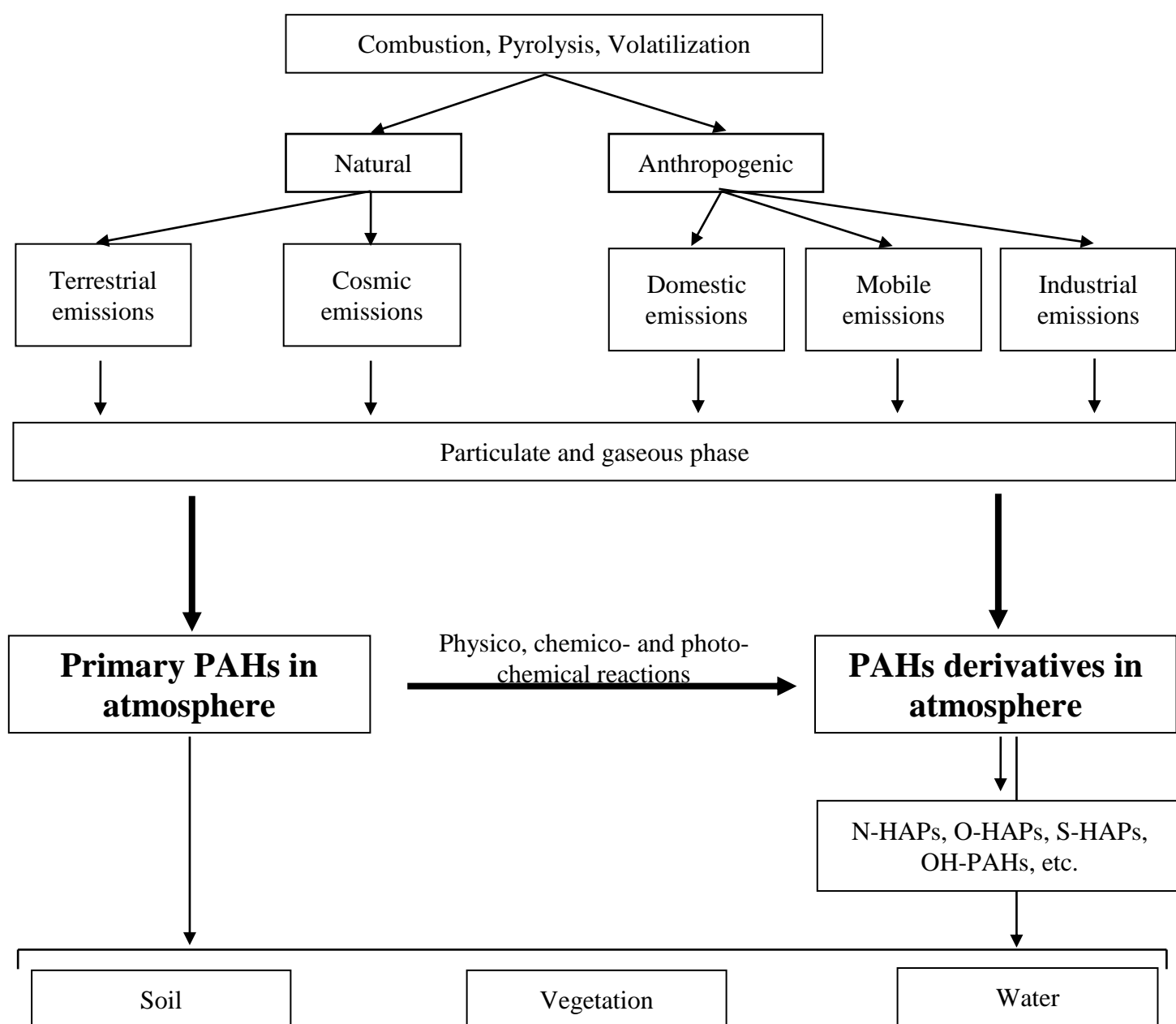


Figure 1: Life cycle of PAHs and their derivatives sources in atmosphere, PAHs and their derivatives are emitted after incomplete combustions and pyrolysis of organic substances, from natural or anthropogenic sources. In nature PAHs can have as origin terrestrial and cosmic. Anthropogenic emissions are divided in three categories: domestic, mobile and industrial. In atmosphere, PAHs and derivatives can be found in gas or particulate phases and are subject to several physico, chemico- and photo-chemical reactions, leading to the formation of other PAHs derivatives. PAHs derivatives can be emitted directly from the primary sources. After their emission in atmosphere, PAHs and derivatives constitute a main source of contamination of soil, vegetation and water.

Figure 2

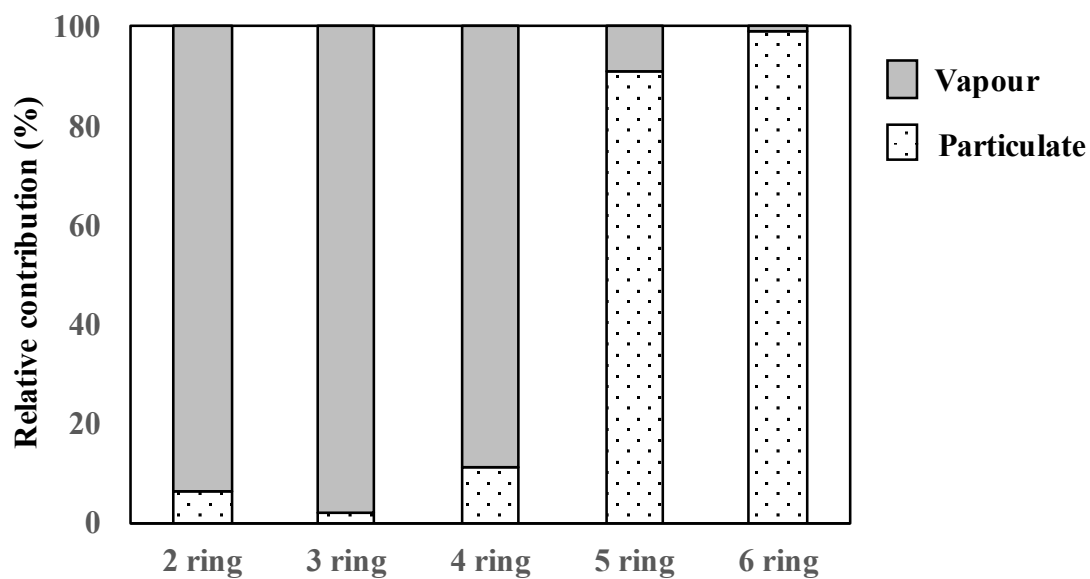


Figure 2: Typical PAHs vapor and particle partition in ambient air. In atmosphere, PAHs gas to particles partition depends on many factors (temperature, pressure, humidity, etc...). PAHs with low molecule weight and high vapor pressure (2-4 rings) are present in the vapor phase, in contrast 4-rings PAHs having low vapor pressure commonly are present in the particulate phase (Adapted from Zhou *et al.* 2013).

Figure 3

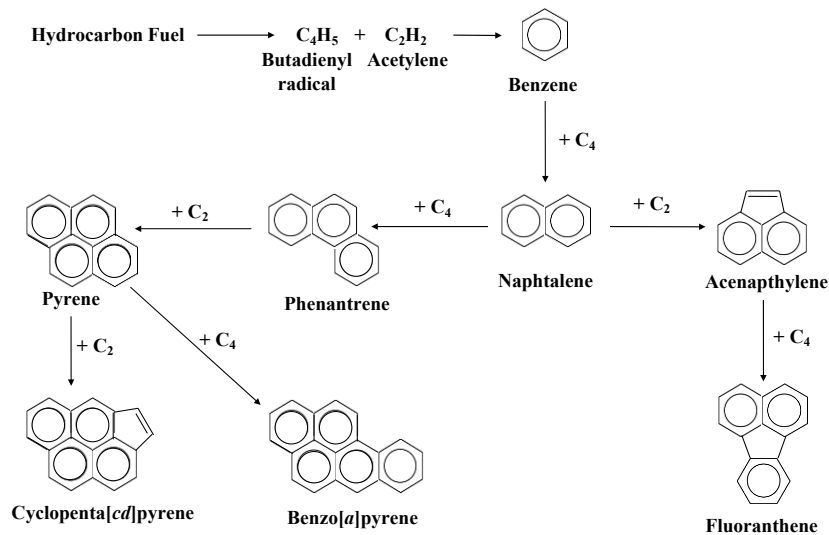


Figure 3: Pyrosynthesis, the proposed pathway for PAH formation. According to Ravindra *et al.* 2008, pyrolysis and pyrosynthesis constitute two main mechanisms explaining PAHs formations. When the temperature of environment exceeds 500 °C, carbon-hydrogen and carbon carbon bounds are broken, forming free organic radicals. These free radicals form acetylene, which further condenses and forms aromatic rings (Krugly *et al.* 2014).

Figure 4

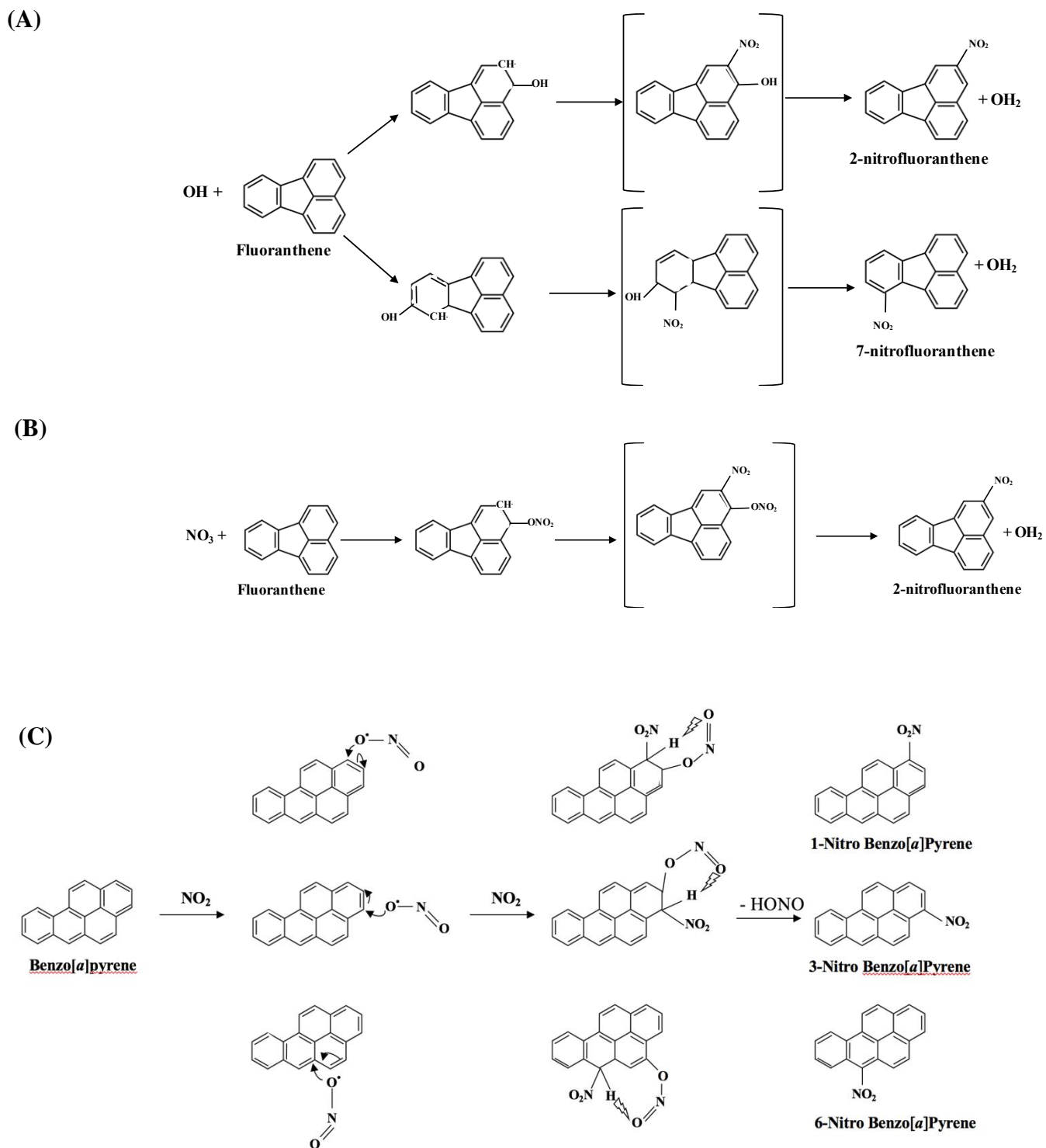


Figure 4: Oxidation mechanisms of Fluoranthene by OH during daytime (A) and by NO₃ during night-time (B) and of Benzo[a]pyrene (C) (Arey et al. 1998, Atkinson et al. 1997, Cazaunau et al. 2010).

Figure 5

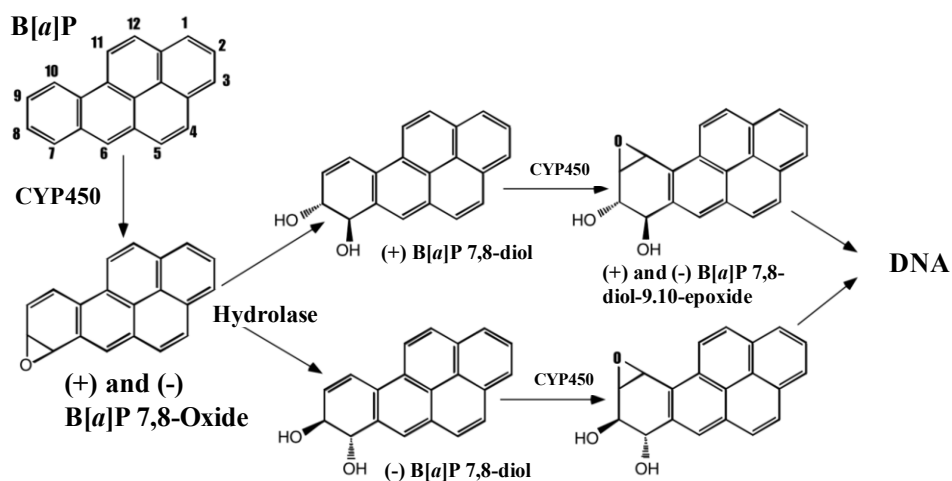


Figure 5: Metabolic activation of B[a]P to bay region epoxides by P450 and epoxide hydrolase (Adapted from Shimada *et al.* 2004).

Figure 6

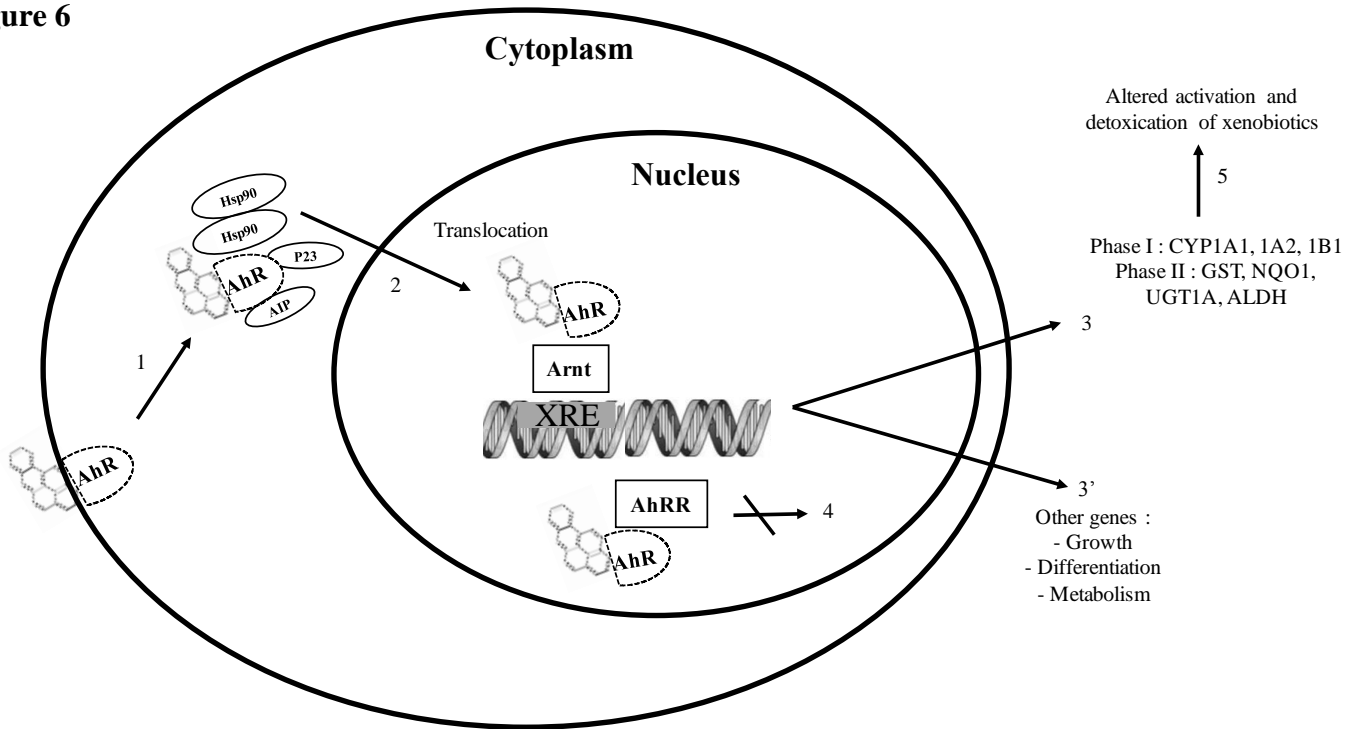
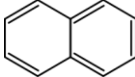
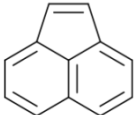
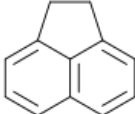
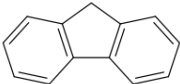
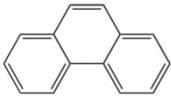
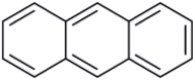
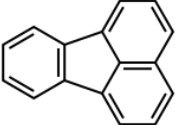


Figure 6: Simplified diagram of the activation of the AhR and the AHR pathway: B[a]P interact with the receptor AhR (1) and it is assisted with other proteins as hsp90, p23 and AIP (2). AhR-PAH complex is translocated to the nucleus, and it makes complex with Arnt in order to activate transcription of several genes as Phase I and Phase II (3) and other genes participating in other cellular responses (3'). If AhRR interacts with the AhR-PAH complex, the transcription is inhibited (4). The transcription is performed in order to response the detoxification of xenobiotics and other molecules (5) (Adapted from Dietrich *et al.* 2010).

Table 1

Table 1: Properties of main PAHs classified by USEPA (* : TEF refers to Toxic Equivalent Factor, introduced to estimate carcinogenic effect of complex PAHs mixtures) (Dat *et al.* 2017).

PAH name	Abbreviations	Number of rings	Molecular mass	Vapor Pressure (Pa, 25°C)	Solubility in water (mg/L)	TEF*	Structure
Naphthalene	NAP	2	128	11.14	31	0.001	
Acenaphthylene	ACY	3	154	3.87	16	0.001	
Acenaphthene	ACE	3	152	3.07	38	0.001	
Fluorene	FLU	3	166	1.66	1.9	0.001	
Phenanthrene	PHE	3	178	1.6x10 ⁻¹	1.1	0.001	
Anthracene	ANT	3	178	8.6x10 ⁻⁴	0.045	0.01	
Fluoranthene	FLT	4	202	8.61x10 ⁻⁴	0.26	0.001	

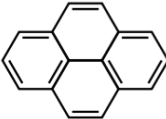
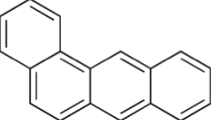
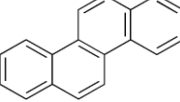
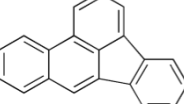
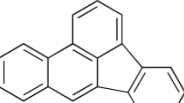
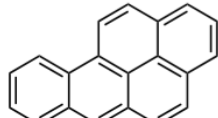
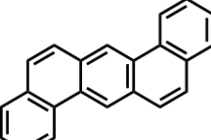
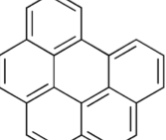
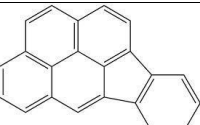

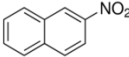

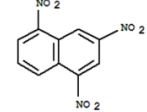
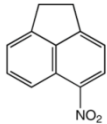
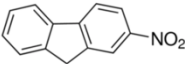
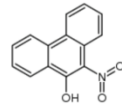
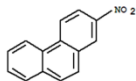
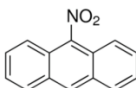
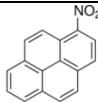
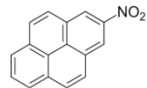
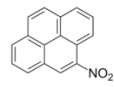
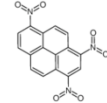
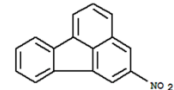
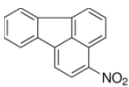
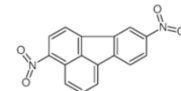
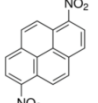
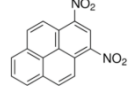
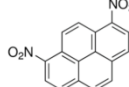
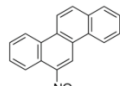
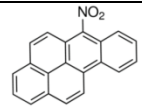
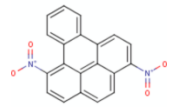
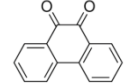
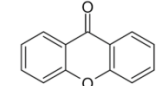
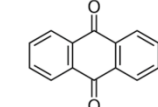
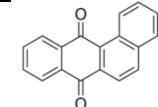
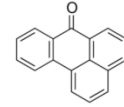
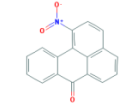
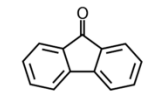
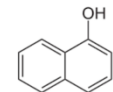
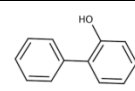
Pyrene	PYR	4	202	5×10^{-5}	0.13	0.001	
Benz[<i>a</i>]Anthracene	BaA	4	228	5.43×10^{-5}	0.011	0.1	
Chrysene	CHR	4	228	4×10^{-6}	0.0002	0.01	
Benzo[<i>b</i>]Fluoranthene	BbF	5	252	5×10^{-7}	0.0015	0.1	
Benzo[<i>k</i>]Flouranthene	BkF	5	252	5.2×10^{-8}	0.008	0.1	
Benzo[<i>a</i>]Pyrene	BaP	5	252	6×10^{-8}	0.0038	1	
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	DahA	5	278	1.33×10^{-8}	0.0006	1	
Benzo[<i>g,h,i</i>]Perylene	BghiP	6	276	1.27×10^{-7}	0.00026	0.01	
Indeno[1,2,3- <i>c,d</i>]Pyrene	IcdP	6	276	1.38×10^{-8}	0.0019	0.1	

Table 2**Table 2:** Properties of mostly used PAHs derivatives in literature.

	PAH derivatives name	Abbreviations	Number of rings	Molecular mass	Vapor Pressure (hPa, 20°C)	Solubility in water (g/L)	Structure
N-PAHs	1-Nitronaphtalene	1Nnap	2	173.171	0.63×10^{-3}	9.18×10^{-3}	
	2-Nitronaphtalene	2Nnap	2	173.171	0.37×10^{-3}	9.18×10^{-3}	
	1,5-Dinitronaphthalene	1,5, DNnap	2	218.17	5.33×10^{-7}	10.715×10^{-3}	
	1,3,8-Trinitronaphthalene	1,3,8 TNnap	2	263.17	1.13×10^{-7}	88.34×10^{-3}	
	5-Nitroacenaphthene	5-Nace	3	199.21	5.46×10^{-5}	0.91×10^{-3}	
	2-Nitrofluorene	2- Nfluo	3	211.22	5.9×10^{-6}	0.216×10^{-3}	
	9-Nitrophenanthrene	9-Nphen	3	223.23	1.79×10^{-6}	0.2915×10^{-3}	
	4-Nitrophenanthrene	4-Nphen	3	223.23	1.79×10^{-6}	0.2915×10^{-3}	
	9-Nitroanthracene	9-Nant	3	223.23	1.6×10^{-6}	0.114×10^{-3}	

N-PAHs

1-Nitropyrene	1-NP	4	247.253	1.11×10^{-7}	0.118×10^{-4}	
2-Nitropyrene	2-NP	4	247.26	7.36×10^{-8}	6.79×10^{-5}	
4-Nitropyrene	4-NP	4	247.26	5.52×10^{-10}	6.79×10^{-5}	
1,3,6-Trinitropyrene	1,3,6-TNP	4	337.25	2.29×10^{-11}	4.2×10^{-5}	
2-Nitrofluoranthene	2-Nflt	4	247.253	3.93×10^{-6}	2.1×10^{-3}	
3-Nitrofluoranthene	3-Nflt	4	247.253	7.36×10^{-8}	1.95×10^{-5}	
3,9-Dinitrofluoranthene	3,9-DNflt	4	292.25	1.21×10^{-9}	6.96×10^{-5}	
1,6-Dinitropyrene	1,6-DNP	4	292.25	1.2×10^{-9}	5.4×10^{-5}	
1,3-Dinitropyrene	1,3-DNP	4	204.76	1.2×10^{-9}	5.4×10^{-5}	
1,8-Dinitropyrene	1,8-DNP	4	204.76	1.2×10^{-9}	5.4×10^{-5}	
6-Nitrochrysene	6-Nchr	4	273.291	1.01×10^{-8}	1.53×10^{-5}	

N-PAHs	6-Nitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	6-NB[<i>a</i>]P	5	297.313	4.14 x10 ⁻¹⁰	3.49x10 ⁻⁶	
	3,6-Dinitrobenzo[<i>a</i>]pyrene	3,6-DNB[<i>a</i>]P	5	342.31	7.65 x10 ⁻¹²	2.71 x10 ⁻⁶	
O-HAPs	Phenanthrenequinone	9,10-PQ	3	208.216	1,133 x10 ⁻⁶	0.4 x10 ⁻³	
	Xanthone	XN	3	196.205	7,79x10 ⁻⁵	4.52 x10 ⁻³	
	Anthraquinone	AQN	3	208.216	1,5x10 ⁻⁷	1.353 x10 ⁻³	
	Benz[<i>a</i>]anthracene-7,12-dione	(BaAQ)	4	258.27	-	-	
	Benzanthrone	BA	4	230.266	53,3	-	
	Nitrobenzoanthrone	Nba	4	275.263	-	-	
	Fluorenone	FLO	3	180.206	7.6 x10 ⁻⁵	Insoluble	
OH-HAPs	1-Naphtol	1-N	2	144,173	0,426x10 ⁻³	866 x10 ⁻³	
	2-Hydroxybiphenyl	2-HBF	2	170.211	0,0026	700 x10 ⁻³	

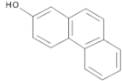
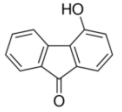
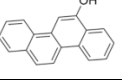

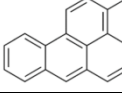
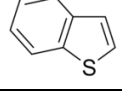
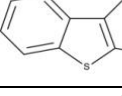
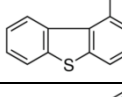
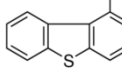
OH-HAPs	2-Hydroxyphenanthrene	2-Hph	3	194.233	-	-	
	2-Hydroxy-9-fluorenone	2-H-9-F	3	196.205	-	-	
	6-Hydroxychrysene	6-Hchr	4	244.293	-	-	
	1-Hydroxypyrene	1-HP	4	218.255	-	0.017	
	3-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyrene	3-HB[<i>a</i>]P	5	268.315	-	-	
PASHs	Benzothiophene	BT	2	134.196	1.33	0,13	
	Dibenzothiophene	DBT	3	184.25	0,026	0.0015	
	Benzo[<i>b</i>]Naphtho[<i>1,2-d</i>]Thiophene	[<i>1,2</i>]BNT	4	234,316	-	-	
	Benzo[<i>b</i>]Naphtho[<i>2,3-d</i>]Thiophene	[<i>2,3</i>]BNT	4	234,316	-	-	

Table 3**Table 3:** PAHs concentrations measured in worldwide ambient air (adapted from Dat *et al.* 2017).

Nation	Concentration	Type of area	Dominant congeners	Sampling time	Reference
Dunkerque - France	4.03 – 72.45 µg/g	Industrial	Dimethylnaphtalene Anthracene	January – September 2000	Billet <i>et al.</i> 2007
Europe and Atlantic Ocean	53–4443 ng/m ³	Remote Background	PHE, FLU	2001-2002	Van Drooge <i>et al.</i> 2010
Germany	0.4–121.4 ng/m ³	Residential	PYR, FLT	Winter (2005 and 2006)	Bari <i>et al.</i> 2010
Spain	2.71–366.9 ng/m ³	Chemical and industrial	PHE, NAP	2008	Ramirez <i>et al.</i> 2011
North China Plain	19.7–89.1 ng/m ³ 89.8–1616.5 ng/m ³ 131–979.2 ng/m ³	Background Rural	PHE, FLO	October 2007 to August 2008	Wang <i>et al.</i> 2011
Dakar - Senegal	0.056 – 0.505 ng/m ³	2 Urban 1 Rural	B[b]Fl I [c,d]P PYR	July – September 2009	Dieme <i>et al.</i> 2012
UK	0.029–0.13 ng/m ³ 0.12–2 ng/m ³ 0.25–1.4 ng/m ³	Rural Urban Suburban	- - -	2008-2010	Brown <i>et al.</i> 2012
Canada	10.2–83.7 ng/m ³ 8.31–52.1 ng/m ³	Urban	-	Summer 2009 Winter 2009	Anastasopoulos <i>et al.</i> 2012
Europe	2.243–1.772 ng/m ³	Urban Background	PHE, FLU, FLT, PYR	1994-2010	Garrido <i>et al.</i> 2014
Cotonou - Benin	0.01 – 0.28 ng/m ³	Urban	PYR CHR B[a]P	November – December 2010	Cachon <i>et al.</i> 2014
Korea	78.8 ± 38.2 ng/m ³	Urban	2-3 Rings	October 2014	Kim <i>et al.</i> 2015
Turkey	30–198 ng/m ³	Urban	PHE, FLT	2008-2009	Birgul <i>et al.</i> 2015
Lebanon	0.217-0.945 ng/m ³	Urban Rural	B[b]Fl, B[g,h,i]Pe, B[e]P,Phe, B[a]P	May-September 2011 September – October 2011	Borgie <i>et al.</i> 2015

Dunkerque	0.3 – 731 ng/m ³	Rural Urban Industrial	Nap B[a]Fl CHR	Spring/Summer 2008 Autumn/Winter 2008/ 2009	Dergham <i>et al.</i> 2015
Saudi Arabia	0.13–515.76 ng/m ³	Urban	PYR, FLT	2011-2012	Bian <i>et al.</i> 2016
Taiwan	69.3–325 ng/m ³	Industrial	NAP, PHE, FLU	Spring and Summer 2012	Lai <i>et al.</i> 2017
Dunkerque - France	0.002-2.67 ng/m ³	Industrial	BbF BkF	March to July 2011	Landkocz <i>et al.</i> 2017
Brazil	0.106 – 13.1 µg/g	Urban	Chrysene Perylene Benzo[<i>a</i>]anthracene	February 2013	Jaegger Franco <i>et al.</i> 2017
Lille, France	0.05-7.64 µg/g	Urban	IP BghiP BeP BaP	April 2013 to July 2013 November 2013 to April 2014	Leclrecq <i>et al.</i> 2017

Table 4**Table 4:** Atmospheric concentrations of nitro-PAHs in some cities from 1990 to 2017.

City	Sampling time	Phase	Σ -N-PAHs (ng/m ³)	Number of N-PAHs	Reference
Texas, USA	August 1990-1991	Gas + TSP	0.28-1.66	10	Wilson <i>et al.</i> 1995
Athens, Greece	Annual 1996	TSP	0.05-0.47	3	Marino <i>et al.</i> 2000
Nagasaki, Japan	July 1997-June 1998	PM _{0.3}	0.00023-0.041	4	Wada <i>et al.</i> 2001
Baltimore, USA	Winter 2001 Summer 2001	PM ₁₀ + gas	0.179–0.525 0.077–0.414	24	Bamford <i>et al.</i> 2003
Los Angeles, USA	Summer 2002 Winter 2003	TSP + gas	0.30–1.29 0.23–0.89	15	Reisen <i>et al.</i> 2005
Vladivostok, Russia	Winter 1999	TSP	0.019–0.176	4	Tang <i>et al.</i> 2005
Seoul, Korea	Winter 2002	TSP	0.138–0.217	4	
4 cities in Japan	Winter 1999	TSP	0.001–0.387	4	
Shenyang, China	Winter 2001	TSP	0.163–0.203	4	
Marseilles, France	Summer 2004	PM ₁₀ + gas	0.135–1.86	17	Albinet <i>et al.</i> 2007
HCMC Vietnam	Jan 2005 - March 2006	PM ₁₀	0.173-0.264	2	Hien <i>et al.</i> 2007
Sao Paulo, Brazil	Aug 2002 - Jul 2003	PM ₁₀	0.018–1.546	16	De castro Vasconcellos <i>et al.</i> 2008
Algiers, Algeria	Summer 2005	PM ₁₀	0.012–0.189	10	Ladji <i>et al.</i> 2009
Göteborg, Sweden	Winter	TSP + gas	0.041–0.130	9	Brorström-Lundén <i>et al.</i> 2010
Athens, Greece	Winter 2014	PM ₁₀	2.26–5.86	6	Tsakas <i>et al.</i> 2010
Mexico City; Mexico	Annual 2006/07	PM ₁₀	0.150–0.503	8	Valle-Hernández <i>et al.</i> 2010
Mexico Valley	Annual 2006	PM _{2.5}	0.11–0.12	9	Amador-Muñoz <i>et al.</i> 2011
Beijing, China	Summer 2008	PM _{2.5}	0.068–1.72	11	Wang <i>et al.</i> 2011
Porto Alegre, Brazil	Winter Summer	PM _{2.5}	0.650–4.58 0.400–2.90	5	Teixeira <i>et al.</i> 2011
Chile, remote-urban	Mar–Apr 2007	PM ₁₀ + gas	0.001–0.038	7	Scipioni <i>et al.</i> 2012
South China, urban	Winter	PM _{2.5}	0.223–0.665	13	Wei <i>et al.</i> 2012
2 cities, China	Aug 2009- Feb 2010	PM _{2.5}	0.04-0.645	12	Wei <i>et al.</i> 2012

3 cities, Poland	Winter 2009	TSP	1.25–4.88	8	Zaciera <i>et al.</i> 2012
Paris, France	Summer 2009	PM ₁₀	0.025-0.175	18	Ringuet <i>et al.</i> 2012
Madrid, Spain	Annual 2008	PM ₁₀	0.074–0.374	5	Barrado <i>et al.</i> 2013
Xi'an, China	Jul 2008 – Aug 2009	PM _{2.5}	0.3-7	12	Bandowe <i>et al.</i> 2014a
Shanghai, China	Winter 2010 Summer 2010	PM _{2.5}	0.187–1.57 0.037–0.285	8	Wang <i>et al.</i> 2014
Chiang Mai, Thailand	Feb–Apr 2010 Aug–Sep 2010	TSP	0.025–0.72 0.007–0.074	13	Chuesaard <i>et al.</i> 2014
Porto Alegre (MAPA), RS, Brazil.	August 2011 August 2012	PM ₁	0-0.047	5	Garcia <i>et al.</i> 2014
WQS, China	Nov-Dec 2010	TSP + gas	0.971-4.143	29	Huang <i>et al.</i> 2014
Araraquara, Brazil	May-June 2016	TSP	0.16-15	8	Souza <i>et al.</i> 2014
Oregon, USA	Spring 2010	PM _{2.5}	0–0.001	5	Lafontaine <i>et al.</i> 2015
North China, rural	Annual 2010/11	PM ₁₀ + gas	0.013–3.70	13	Li <i>et al.</i> 2015
Xi'an, China	Spring 2012	TSP + gas	7.04–16.6	12	Wei <i>et al.</i> 2015a
Birmingham, UK	Winter 2014	PM _{2.5}	0.078–11.7	5	Alam <i>et al.</i> 2015
Braga, Portugal	Feb 2013	PM ₁₀	0.3-19.8	15	Alves <i>et al.</i> 2016
Oporto, Portugal			9.13-16.09		Alves <i>et al.</i> 2017
Florence, Italy	Jan 2013 – Feb 2014	PM _{2.5}	3.36-10.8	10	
Athens, Greece			2.72-15.38		
Xi'an, China	March 2012	Indoor and outdoor PM _{2.5}	50.3-116.6	8	Wang <i>et al.</i> 2017

Table 5**Table 5:** Atmospheric concentrations of O-PAHs in some cities from 1995 to 2017.

Nation	Sampling time	Phase	Σ O-PAHs (ng/m ³)	Number of O-PAHs	Reference
Texas, USA	August 1990-1991	Gas + TSP	0.55-2.07	4	Wilson <i>et al.</i> 1995
Fresno, USA	Annual 2004-2005	TSP	2.36-387	11	Chung <i>et al.</i> 2006
Gwangju, Korea	March - May 2001	PM _{2.5}	5.4 ± 4.3	5	Park <i>et al.</i> 2006
2 cities, Santiago, Chile	Winter-Spring 2000	PM ₁₀	6-12.3	11	Sienra <i>et al.</i> 2006
Marseilles – France			2.603-13.19		
- Urban	July 2004	PM ₁₀ + gas	0.704-12.098	8	Albinet <i>et al.</i> 2007
- Sub-Urban			0.631-3.03		
- Rural					
Chamonix Valley	Winter 2002-2003 Summer 2003	PM ₁₀ + gas	1.14-679.76 3.34-587.22	8	Albinet <i>et al.</i> 2008
Maurienne Valley	Winter 2002-2003 Summer 2003	PM ₁₀ + gas	9.02-673 0.58-547.04	8	Albinet <i>et al.</i> 2008
Kyoto, Japan	Annual 2007	PM ₁₀	0.62-3.12	4	Kojima <i>et al.</i> 2010 a
Paris, France	Summer 2009	PM ₁₀	0.113-1.5	9	Ringuet <i>et al.</i> 2012
Qingyuan - China	Aug 2009 Jun- Feb 2010	PM _{2.5}	0.519-1.246	6	Wei <i>et al.</i> 2012
Incheon, South Korea	2009-2010	PM _{2.5}	0.15-2.36	6	Choi <i>et al.</i> 2012
2 cities, China	Aug 2009- Feb 2010	PM _{2.5}	0.519-1.24	6	Wei <i>et al.</i> 2012
WQS, China	Nov-Dec 2010	TSP+gas	4.18-13	6	Huang <i>et al.</i> 2014 a
Araraquara, Brazil	May-June 2016	TSP	0.69-6	3	Souza <i>et al.</i> 2014
Birmingham, UK	Summer 2012	PM ₁₀	3.13 ± 2.64	4	Keyte <i>et al.</i> 2016

Braga, Portugal	Feb 2013	PM ₁₀	1.97-44.4	15	Alves <i>et al.</i> 2016
Oporto, Portugal			19-41.78		
Florence, Italy	Jan 2013 – Feb 2014	PM _{2.5}	3.09-11.26	15	Alves <i>et al.</i> 2017
Athens, Greece			0.7-12.64		
Xi'an, China	March 2012	Indoor and outdoor PM _{2.5}	19.1-16.4	3	Wang <i>et al.</i> 2017
4 cities, China	Winter 2015	PM _{2.5}	84.70-180.01	11	Niu <i>et al.</i> 2017
2 cities, China	Winter 2013 Summer 2013	PM ₉	23-54 11-29	7	Ren <i>et al.</i> 2017
Seoul, South Korea	2006-2007	PM ₁₀	1.47-8.70	7	Lee <i>et al.</i> 2017

Table 6**Table 6:** Application of pretreatment and analytical methods for N-, O and OH-PAHs in airborne particles since 1995.

PAHs	Phase	Extraction	Analysis	References
10 N PAHs 4 O PAHs	TSP	- Extraction with dichloromethane (16 h) - Concentration by Kuderna-Danish evaporation	GC/MS using negative chemical ionization	Wilson <i>et al.</i> 1995
4 N-PAHs	PM ₁₀ , PM _{2.5}	- Solid phase extraction (SPE)	GC/ECD	Jinhuia <i>et al.</i> 2000
4 N-PAHs	TSP	- Hayakawa's method - Hexane, benzene/ ethanol (3:1,v/v) (Haykawa <i>et al.</i> 1996)	HPLC with chemi- luminescence detection	Wada <i>et al.</i> 2001
28 N-HAPs	Air and diesel particulate reference materials	- Ressorized-Fluid Extraction (PFE) / Soxhlet extraction) - Extraction in Dichloromethane	GC/NICI-MS SIM	Bamford <i>et al.</i> 2003
N-PAHs O-PAHs	Urban air samples	- Supercritical Fluid Extraction (SFE) - Dichloromethane - Rotary evaporation - Suspension in n-Hexane	GC-MS/ECD	Castell <i>et al.</i> 2003
17 N-PAHs 9 O-PAHs	Gaz + PM ₁₀	- Dionex ASE 200 and ASE 300 systems - Extraction in Dichloromethane - Evaporation under N flow - Suspension in Dichloromethane	GC/NICI-MS SIM	Albinet <i>et al.</i> 2007
17 N-PAHs 8 OH-PAHs	Gaz + PM ₁₀	- Dichloromethane + Pressurised Liquid Extraction (PLE) - Evaporation under N flow - Suspension in Dichloromethane	GC/NICI-MS SIM Including of Liquid chromatography purification procedure + solid phase extraction	Albinet <i>et al.</i> 2008 a-b
4 N-PAHs 6 O-PAHs	Biodiesel Exhaust emission	- Extraction with dichloromethane in ultrasonic bath for 20 min (Three times) - Evaporation - Column (glass wool, silica gel, alumina and anhydrous sodium sulphate) - Evaporation under N flow of cyclohexane	GC/NCI-MS with capillary column	Karavalakis <i>et al.</i> 2010

N-PAHs	PM ₁₀	<ul style="list-style-type: none"> - Microwave (40 min, 120°C, 900 V) - Extraction in Dichloromethane - Evaporation under N flow - Suspension in acetonitrile 	<p>Chromatograph Eclipse XDB C-18 column - 36.7°C - Agilent 1100 automatic injector</p>	Barrado <i>et al.</i> 2012, 2013
OH-PAHs		<ul style="list-style-type: none"> - Ultrasonication (30 min) - Extraction in methanol - Evaporation under N flow - Suspension in methanol - Injected into the HPLC system. 		
18 N-HAPs 9 O-HAPs	PM ₁₀	<ul style="list-style-type: none"> - Pressurized Solvent Extraction - Dichloromethane - Suspension Dichloromethane - Purification of extracts on alumina and silica - SPE cartridges - Dissolving of residue 	GC/NICI-MS	Ringuet <i>et al.</i> 2012
12 N-HAPs 6 O-HAPs	PM _{2.5}	<ul style="list-style-type: none"> - Samples spiked with appropriate amounts of standards - Ultrasonication (dichloromethane) - Filtration, concentration and separation by silica–alumina column - Dissolving in n-Hexane 	GC/MS Electron Capture Negative Ion (ECNI) mode and SIM	Wei <i>et al.</i> 2012
8 N-PAHs 3 O-PAHs	TSP	<ul style="list-style-type: none"> - Soxhlet - Dichloromethane 	GC-MS operated in SIM mode with Programmed Temperature Volume (PTV) injector. GC-MS SIM	Souza <i>et al.</i> 2014
8 N-PAHs	PM _{2.5}	<ul style="list-style-type: none"> - Samples spiked with appropriate amounts of recovery standards - Extraction with Dichloromethane and applied to silica gel/Al₂O₃ chromatography - Eluate with hexane: dichloromethane (1:1) -HPLC 	GC-MS coupled to HewlettePackard model 5975 MSD quadrupole analyzer.	Wang <i>et al.</i> 2014
9 N-PAHs	PM _{2.5}	<ul style="list-style-type: none"> - Accelerated Solvent Extractor (ASE) - Spiked with deuterated N and OH-PAHs - Drying on dried on Na₂SO₄ 	<ul style="list-style-type: none"> - Extracts spiked with internal standards - GC/MS using Negative Chemical 	Bandow <i>et al.</i> 2014

6 OH-PAHs		- Evaporation	Ionization mode with CH4	
			- GC/MS - EI-mode	
11 N-PAHs	TSP	- ASE Dionex - Clean-up/fractionation	GC-MS - Negative Chemical Ionization NCI	Wei <i>et al.</i> 2015
15 O-PAHs			GC-MS - Electron Ionization (EI)	
35 N-PAHs 35 O-PAHs	PM ₁₀	- Extraction with dichlorométhane - Dionex ASE 200 - 3 cycles of 6 min for heat and static times - Concentration - Purification on alumina SPE cartridges - Elution with Dichloromethane - 2nd concentration, dissolution in isooctane - 2nd purification on silica SPE cartridges - Elution in dichloromethane – pentane - QuEChERS-like extraction	GC–NICIMS	Albinet <i>et al.</i> 2014
13 N-PAHs	Airborne PM	- Spiked with deuterated - Soxhlet Extraction (hexane/acetone) - Evaporation, washing with KOH solution - Cleaning 3% water deactivated alumina - Elution with hexane/dichloromethane	- Spiked with internal standards - GC/EI-MS - GC-MS with Electron Capture Negative Ionization (ECNI)	Lin <i>et al.</i> 2015
15 N-PAHs	PM ₁₀	- Samples spiked with a mixture of deuterated N- and O-PAHs - Extraction two times by ASE (dichloromethane, acetone-dichloromethane) - Concentration in Hexane	- Spiked with internal standards - GC/NCI –MS	Alves <i>et al.</i> 2016
15 O-PAHs		- Transferred onto silica gel columns and fractionated using solvents of different polarity - Elution and addition of toluene	- Spiked with internal standards - GC/EI -MS	
7 O-PAHs	TSP	- Extraction (mixture of dichloromethane/methanol) - Concentration to dryness and derivatized with N, O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)	- GC-MS	Ren <i>et al.</i> 2017

Table 7**Table 7:** Some studies described toxic effects of PAHs.

Type of studies	Species or cells	PAHs	Biological Markers	References
<i>In-vivo</i>	20 Male Lister hooded rats	18-PAHs	- Development of method for the determination of PAHs and O-PAHs in rat brain	<i>Grova et al. 2011</i>
<i>In-vitro</i>	BEAS-2B	Naphtalene	- Cytotoxicity - Proinflammatory protein expression	<i>Koike et al. 2014</i>
<i>In-vitro</i>	H4IIE rat hepatoma cells	Dibenzo (a,h) Anthracene Benzo(a)pyrene Benzo(a)anthracene Chrysene	- Differential expression of CYP1A1 and CYP1A2	<i>Kaisarevic et al. 2015</i>
<i>In-vivo</i>	Male FVB mice	Fluoranthene Phenanthrene	- Micronucleus	<i>Abramsson-Zetterberg et al. 2015</i>
<i>In-vitro</i>	NHBE COPD-NHBE cells	BaP	- Oxydative damage - Cytokine secretion - OH-B[a]P DNA adducts	<i>Leclercq et al. 2016</i>
<i>In-vitro</i>	L132 cells	BaP	- Cell cycle - TP53 and P21 gene expression - Protein concentrations of phosphor-P53, P21, BCL-2, BAX, phosphor-CDK1, and phosphor-RB - Microsatellite status	<i>Abbas et al. 2016</i>
<i>In-vitro</i>	BeWo and JEG-3 human placental cell line	Naphthalene Anthracene Phenanthrene Pyrene	- Cytotoxicity (XTT, LDH, AP) - Endocrine activity (progesterone and estradiol secretion) - Apoptosis (cyclin A1, cyclin D2, cdk 2, cdk 4, Bcl-xl, Bax, and caspase-3 protein expression)	<i>Drwal et al. 2017</i>
Epidemiological study	<i>Human urine from:</i> 57 males and 133 females; including 16 urine samples collected from 3 to 12- year-old children	PAHs in PM ₁₀	- Malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) - Identification of any association between OH-PAHs, MDA, 8-OHdG with age and sex - Determination of the relationship between PAHs	<i>Bortey-Sam et al. 2017</i>

exposure and occurrence of respiratory diseases.

<i>In-vitro</i>	Nonluteinized granulosa cells (HGrC1) Granulosa tumor cells (COV434)	Mixtures of 16 priority (PAHs)	<ul style="list-style-type: none">- Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) and Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AHRR) genes- Expression and activity of target genes cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and catechol-O-methyltransferase (COMT)	Zajda <i>et al.</i> 2017
-----------------	---	--------------------------------	--	--------------------------

Epidemiological study	Umbilical cord serum of 98 mother-infant pairs	16 PAHs	<ul style="list-style-type: none">- Complex pathways involved in disorders of human reproductive health associated with prenatal exposure to PAHs.	Yin <i>et al.</i> 2017
-----------------------	--	---------	--	------------------------

Table 8**Table 8:** Toxic effects of N-PAHs from 1986 to 2017

Type of studies	Species or cells	PAHs-Derivatives	Biological Markers	References
<i>In-vivo</i>	Fischer-344 rats	1-Nitropyrene	Metabolic activation (Reduction of Nitro group)	Dutcher <i>et al.</i> 1986
<i>In-vitro</i>	BALB/3T3 A31-I-I	1-Nitropyrene 2-Nitropyrene 4-Nitropyrene	Transforming activity	Sheu <i>et al.</i> 1994
<i>In-vitro</i>	Salmonella	1-,2-,3-, and 6-nitrobenzo[<i>a</i>]pyrenes	Mutagenicity	Fu <i>et al.</i> 1994
<i>In-vitro</i>	RTE cells	1,6-Dinitropyrene 6-Nitrochrysene 4-Nitropyrene 1-Nitropyrene	Cytotoxicity Preneoplastic transformation	West <i>et al.</i> 1994
<i>In-vivo</i>	New born Female rat	1-Nitropyrene	Carcinogenicity	Imaida <i>et al.</i> 1995
<i>In-vitro</i>	Male Wistar rat hepatocytes V79NH NCI-H322	4-Nitropyrene 6-nitrochrysene 3-nitrofluoranthene	Genotoxicity (DNA adduct formation)	Topinka <i>et al.</i> 1998
<i>In-vitro</i>	A549	1-Nitropyrene	ROS generation	Kim <i>et al.</i> 2005
<i>In-vitro</i>	Hepa1c1c7	1,3-Dinitropyrene 1-Nitropyrene 1, 8-Dinitropyrene	DNA damage by DNA adduct formation Increased phosphorylation of p53 Accumulation of cells in S-phase.	Landvik <i>et al.</i> 2007

<i>In-vitro</i>	COS-7	1-Nitropyrene	Genotoxicity (1-NP adducts)	Watt <i>et al.</i> 2007
<i>In-vitro</i>	BEAS-2B	1-Nitropyrene	Pro-inflammatory response (pentaxin, IL-1beta, IL-6, IL-8, CXC motif ligand 2 (CXCL2), and TNF-alpha) ROS generation Intracellular GSH decrease.	Park <i>et al.</i> 2009
<i>In-vivo</i>	<i>Drosophila Melanogaster</i>	1-Nitronaphthalene 1,5-Dinitronaphthalene 2-Nitrofluorene 9-Nitroanthracene	Genotoxicity (Homologous recombination (HR))	Dihl <i>et al.</i> 2008
<i>In-vitro</i>	P19/A15 cells	Quinoline Isoquinoline Quinazoline 6-Methylquinoline Indole 2-Methylindole 1,7-Phenanthroline 4,7-Phenanthroline Phenanthridine 1,10-Phenanthroline Acridine Phenazine Benz[a]acridine Benz[c]acridine Dibenz[c,h]acridine 7H-Dibenzo[c,g]carbazole Dibenz[a,i]acridine Dibenz[a,h]acridine Dibenz[a,j]acridine	Teratogenicity (retinoid signaling)	Benisek <i>et al.</i> 2008

Epidemiological study	55 healthy non-smokers from the University of Medicine and Dentistry of New Jersey and Rutgers University community and surrounding New Jersey	1 Nitropyrene in Diesel Exhaust particles: metabolites after exposure 1-aminopyrene	Biomarker of exposure to 1 Nitropyrene	Laumbach <i>et al.</i> 2009
<i>In-vitro</i>	BEAS-2B	1-Nitropyrene (1-NP) 3-Nitrofluoranthene (3-NF) 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA)	Pro-inflammatory processes CXCL8 (IL-8) and TNF- α expression DNA damage resulting in accumulation of cells in S-phase and a marked increase in apoptosis	Ovrevik <i>et al.</i> 2010
<i>In-vitro</i>	BEAS-2B	2-Nitrobenzanthrone (2-NBA) 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA)	Apoptosis triggered by the DNA damage response Activation of P53	Oya <i>et al.</i> 2011
<i>In-vitro</i>	P19/A15 cells	1,7-phenanthroline	Differentiation process and embryonic development by interfering with ATRA signaling and by modulating levels of Oct-4	Benisek <i>et al.</i> 2011
<i>In-vivo</i>	<i>Pleuronectes Yokohamae</i>	1-Nitropyrene 3-Nitrofluoranthene 6-Nitrochrysene 2-Nitrofluorene 1-Nitronaphthalene 3-Nitrophenanthrene 1, 8-Dinitropyrene 1-Nitropyrene-d9	Genotoxicity (micronuclei (MN and other nuclear abnormalities (NA) formation in erythrocytes)	Bacolod <i>et al.</i> 2013
<i>In-vitro</i>	HepG2 cells XP2OS(SV)	3-nitrobenzanthrone	Adduct formation DNA repair Translation DNA synthesis	Kawanishi <i>et al.</i> 2013
<i>Epidemiological study</i>	24 taxi drivers from Shenyang, China,	DE particles including N-PAHs	1-NP metabolites as markers of ongoing exposure to DE	Miller-Schulze <i>et al.</i> 2013
<i>Epidemiological study</i>	82 male industry workers	N-PAHs metabolites after exposure to PM _{2.5} 1 aminonaphthalene 2-aminonaphthalene	Oxidative genotoxicity (8-OHdG)	Neophytou <i>et al.</i> 2014

1-aminopyrene

<i>In-vivo</i>	Mummichog (<i>Fundulus heteroclitus</i>)	1-Nitronaphthalene 1-Nitropyrene	Reprotoxicity	Onduka <i>et al.</i> 2015
<i>Epidemiological study</i>	Two groups: - Occupational exposure to DE - No occupational exposure to DE	PM _{2.5} - 1-Nitropyrene - 2-nitropyrene - 2-nitrofluoranthene	Urinary metabolites	Miller-Schulze <i>et al.</i> 2016
<i>In-vivo</i>	Male Wistar Rats	1-Nitropyrene	DNA damage and repair, oxidative stress and metabolism	Li <i>et al.</i> 2017
<i>In-vivo</i>	<i>Tilapia, O. Niloticus</i>	1-Nitropyrene	Genotoxicity and Oxidative stress (Micronuclei and other nuclear abnormalities, Activity of glutathione peroxidase, lipid peroxidation, protein and DNA oxidation)	Bacolod <i>et al.</i> 2017

Table 9**Table 9:** Toxic effects of some O-PAHs, OH-PAHs and S-PAHs

Type of studies	Species or cells	PAHs-Derivatives	Biological Markers	References
<i>In-vivo</i>	Zebra fish	O-PAHs: Phenanthrenequinone 1,9-benz-10-anthrone Xanthone Benz(a)anthracene-7,12-dione 9,10-anthraquinone	AHR activation CYP1A immunohistochemistry	Knecht <i>et al.</i> 2013
<i>In-vitro</i>	A549 cells (Air-Liquid interface)	O-PAHs in DE	Oxidative stress (GSH and HO-1) Cytotoxicity (LDH and Alamar Blue assay) Inflammation (IL-8).	Kooter <i>et al.</i> 2013
<i>In-vivo</i>	Zebra fish	Benz[a]anthracene- 7,12-dione	Metabolomic analysis	Elie <i>et al.</i> 2015
<i>In-vitro</i>	RAW264.7	9-Fluorenone	Immune response Cytotoxicity Reactive oxidative stress Inflammation AhR receptor	Wang <i>et al.</i> 2017
<i>In-vitro</i>	A549	O-PAHs in PM _{2.5}	Cells viability Production of nitric oxide Tumor necrosis factor a (TNF-a) Interleukin 6 (IL-6)	Niu <i>et al.</i> 2017
<i>In-vitro</i>	Salmonella TA98, TA100, and TA104	Phenanthro[3,4-b]thiophene Phenanthro[4,3-b]thiophene	Mutagenicity DNA Adducts	Swartz <i>et al.</i> 2009
<i>In vitro</i>	Salmonella typhimurium strains TA98 and TA100	5-nitrobenzo[b]naphtho[2,1- d]thiophene	Mutagenicity and Genotoxicity DNA Adducts	King <i>et al.</i> 2001

Résumé

La pollution de l'air et les particules fines ($PM_{2.5}$) ont été classées cancérogènes (groupe 1) par le Centre International de Recherche sur le Cancer en 2013. Cette fraction particulaire représente un mélange complexe dont la composition, très variable, influe sur la toxicité. Cependant, peu d'études ont déterminé l'implication respective des différentes fractions chimiques constitutives des PM dans leurs effets toxiques. Dans ce travail de thèse, des particules fines ($PM_{2.5-0.3}$) et quasi-ultrafines ($PM_{0.3}$) ont été échantillonnées au niveau d'un site urbain à Beyrouth (Liban). Après avoir réalisé la caractérisation physico-chimique de ces deux types de particules, leurs effets toxiques (cytotoxicité globale, activation métabolique, génotoxicité, inflammation, stress oxydant, autophagie et apoptose) ont été étudiés sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). L'analyse des fractions organiques a révélé des différences entre les teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de même qu'en congénères oxygénés (O-HAP) et nitrés (N-HAP), respectivement 43, 17 et 4 fois plus élevées dans les $PM_{0.3}$ que dans les $PM_{2.5-0.3}$. L'étude toxicologique a porté sur les particules fines considérées dans leur entièreté ($PM_{2.5-0.3}$), la fraction organique extractible ($EOM_{2.5-0.3}$) et la fraction non-extractible par le dichlorométhane ($NEM_{2.5-0.3}$). De plus, les effets spécifiques de la fraction organique extraite des particules quasi-ultrafines ($EOM_{0.3}$) ont été comparés à ceux de la fraction organique extraite des particules fines ($EOM_{2.5-0.3}$). Nos résultats montrent que chacune des fractions considérées a été capable d'activer au moins un des mécanismes étudiés. Les $PM_{2.5-0.3}$ ont induit des effets toxiques généralement plus marqués que les $EOM_{2.5-0.3}$ et $NEM_{2.5-0.3}$. La fraction organique des particules quasi-ultrafines ($EOM_{0.3}$), plus riche en composés organiques et notamment en HAP et autres congénères, est apparue responsable d'effets délétères globalement plus importants que celle extraite des particules fines ($EOM_{2.5-0.3}$). Les résultats de ce travail ont apporté des éléments nouveaux sur la toxicité relative des différentes fractions extractibles et non extractibles des particules fines et soulignent le rôle crucial joué par les particules ultrafines, encore trop peu étudiées.

Abstract

Air pollution and particulate matter ($PM_{2.5}$) were classified as carcinogens (group 1) by the International Agency for Research on Cancer in 2013. This particulate fraction represents a complex mixture with a highly variable composition influencing the toxicity. However, few studies have determined the respective involvement of the different chemical fractions of PM in their toxic effects. In this work, fine particles ($PM_{2.5-0.3}$) and quasi-ultrafine particles ($PM_{0.3}$) were sampled in an urban site located in Beirut (Lebanon). After performing the physicochemical characterization of these two types of particles, their toxic effects (global cytotoxicity, metabolic activation, genotoxicity, inflammation, oxidative stress, autophagy and apoptosis) were investigated on a human bronchial epithelial cell line (BEAS- 2B). The analysis of the organic content revealed differences between the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as well as oxygenated (O-PAH) and nitrated (N-PAH) congeners, respectively 43, 17 and 4 times higher in $PM_{0.3}$ than in $PM_{2.5-0.3}$. The toxicological study was based on the comparison of the toxicity of the fine particles considered in their entirety ($PM_{2.5-0.3}$), the extracted organic fraction ($OEM_{2.5-0.3}$) and the fraction not extracted by the dichloromethane ($NEM_{2.5-0.3}$). In addition, the specific effects of the organic fraction extracted from the quasi-ultrafine particles ($OEM_{0.3}$) were compared with those of the organic fraction extracted from the fine particles ($OEM_{2.5-0.3}$). Our results showed that all the studied fractions were able to induce at least one of the studied mechanisms. $PM_{2.5-0.3}$ was able to induce toxic effects greater than those induced by $OEM_{2.5-0.3}$ and $NEM_{2.5-0.3}$. The organic fraction extracted from the quasi-ultrafine particles ($OEM_{0.3}$), richer in organic compounds and in particular in PAHs and other congeners, appeared to be responsible for deleterious effects globally greater than that extracted from the fine particles ($OEM_{2.5-0.3}$). The results of this work have brought new elements on the relative toxicity of the different fractions of the fine particles and underline the crucial role played by ultrafine particles, still too little studied.