



HAL
open science

Etude en Interface Air-Liquide de la toxicité des Composés Organiques Volatils lors d'expositions répétées : Cas du toluène, de ses homologues et des émissions issues de son traitement catalytique

Clémence Méausoone

► **To cite this version:**

Clémence Méausoone. Etude en Interface Air-Liquide de la toxicité des Composés Organiques Volatils lors d'expositions répétées : Cas du toluène, de ses homologues et des émissions issues de son traitement catalytique. Médecine humaine et pathologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2019. Français. NNT : 2019DUNK0545 . tel-02887101

HAL Id: tel-02887101

<https://theses.hal.science/tel-02887101v1>

Submitted on 2 Jul 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.



Université du Littoral Côte d'Opale

UCEiV EA4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant

Ecole Doctorale 104 SMRE, Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THESE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Discipline : **Toxicologie**

Etude en Interface Air-Liquide de la toxicité des Composés Organiques Volatils lors d'expositions répétées. Cas du toluène, de ses homologues et des émissions issues de son traitement catalytique

Présentée par :

Clémence MÉAUSOONE

Le 03 Octobre 2019

Composition du jury :

Pr Christelle MONTEIL

Pr Luc FERRARI

Dr Ghislaine LACROIX

Dr Maurizio GUALTIERI

Pr Stéphane SIFFERT

Dr Sylvain BILLET

Dr Yann LANDKOCZ

Pr Dominique COURCOT

Université de Rouen Normandie

Université de Lorraine

INERIS

ENEA

Université du Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Encadrant

Encadrant

Directeur

A mes parents,
A Jeanne et Louise

« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

Remerciements

Le doctorat a été pour moi une expérience enrichissante que ce soit sur le plan scientifique que personnel. Mais ce projet n'aurait pu se concrétiser sans la participation, la contribution et le soutien de nombreuses personnes. Je tiens, à travers ces quelques lignes, à montrer toute ma gratitude à celles et ceux qui m'ont aidé, avec gentillesse et bienveillance pendant ces trois années.

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ma thèse, le Pr Christelle Monteil et le Pr Luc Ferrari pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche. Merci au Dr Maurizio Gualtieri d'avoir participé à mon jury de thèse en tant qu'examineur. Enfin merci au Pr Stéphane Siffert et au Dr Ghislaine Lacroix, qui en plus du rôle d'examineur, ont participé à mes comités de suivi de thèse. Vos conseils et votre expérience m'ont énormément aidé à mener à bien mes travaux.

Un grand merci au Pr Dominique Courcot, mon directeur de thèse pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon doctorat au sein de l'équipe CTEA. Vous avez toujours réussi à vous rendre disponible et être à l'écoute des petits tracas de ma thèse. Votre encadrement bienveillant m'a toujours rassuré et a fait que ces trois années se déroulent dans des conditions de travail optimales. Venant du pays de la mirabelle, je ne pouvais faire ma recherche qu'avec vous, qui affectionnez tant ce fruit sucré.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes deux encadrants, Dr Sylvain Billet et Dr Yann Landkocz, pour avoir compris mon stress et su canaliser toutes mes idées quelque fois démesurées. Sylvain, merci pour ta confiance depuis mon arrivée en stage de master 2 et également de m'avoir permis la personnalisation de mon projet de recherche sans jamais douter. Un grand remerciement à Yann qui a été là en toutes circonstances pour m'aider et me conseiller. Tu m'as transmis le plaisir de la recherche avec passion et bonne humeur. Même si deux Lorrains ne pouvaient que s'entendre, j'ai eu beaucoup de chance de te compter parmi mon encadrement et j'espère que notre collaboration ne s'arrêtera pas là.

Je remercie également les membres du projet Interreg V avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Pr Stéphane Siffert et Pr Renaud Cousin qui m'ont initiée au principe de l'oxydation catalytique, au docteur Lucette Gennequin Tidahy pour sa précieuse aide lors des expérimentations et à Rebecca El-Khawaja, doctorante en catalyse, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. L'équipe du CCM, Dr Fabrice Cazier, Dorothee Dewaele, Paul Genevray et Coralie Pusca dont la bonne humeur et le soutien ont été important pour le volet analyse chimique de mon projet. Vous m'avez appris qu'une expérience ne fonctionnait correctement qu'après 17 h et que saturer une cartouche TENAX n'était pas la meilleure des idées.

J'ai une pensée particulière pour tous les doctorants et collègues que j'ai eu la chance de rencontrer et que je peux compter aujourd'hui parmi mes amis. Merci à Gauthier Tremolet et Marianne Seigneur pour leur disponibilité et leur aide pendant les manip. Guitta, tu m'as accueilli en stage sur ton projet de thèse et notre amitié depuis n'a été que grandissante. Je n'oublierai pas non plus les bons moments passés avec Cyril, Amélie et Simone. Les déjeuners et pauses café sont plus tristes depuis que vous êtes partis. Avec Corentin et Tarek, mes jumeaux de thèse, nous avons vécu ensemble les différentes étapes du doctorat. Votre présence a rendu les soirées et les week-ends de travail plus agréables. Un grand merci à la team UMA, Patrick, Marc et Sarah pour leurs blagues communicatives. Je remercie également les chercheurs et enseignants-chercheurs, Fred, Cédric, Anthony, François, Pascal, Eric et Perrine pour vos conseils avisés et les bons moments passés en votre compagnie. Je n'oublie pas tous les doctorants et post-doctorants de l'UCEIV : Sara, Muriel, Ghidaa, Lamia, Stéphanie, Jinane, Hadi, Clémence, Tracy et Nancy. La nourriture Libanaise a été pour mon estomac et moi-même une grande découverte !!

Un immense merci à Mathieu pour ton extrême patience, ton écoute et ta présence à mes côtés pendant ces trois années.

Je ne pourrais finir sans remercier mes parents, Odile et Pierre-Jean et mes petites sœurs, Jeanne et Louise. Un grand merci pour toujours avoir cru en moi ! Votre amour et vos encouragements indéfectibles ont été une aide précieuse pendant ces années d'études.

Soutien financier

Ce doctorat s'inscrit dans le cadre du projet européen Interreg V France-Wallonie-Vlaanderen « Depollutair ». Le projet de recherche a été financé par l'Union Européenne, ainsi que par la région Hauts-de-France et le projet CPER Climibio. La thèse a été co-financée par le projet Interreg V et l'Université du Littoral Côte d'Opale.



UNION EUROPÉENNE
EUROPESE UNIE



Valorisation scientifique

Article scientifique dans le cadre de la thèse :

Clémence MÉAUSOONE, Rebecca EL-KHAWAJA, Gauthier TREMOLET, Stéphane SIFFERT, Renaud COUSIN, Fabrice CAZIER, Sylvain BILLET, Dominique COURCOT, Yann LANDKOCZ (2019) "In vitro toxicological evaluation of emissions from catalytic oxidation removal of industrial VOCs by air/liquid interface (ALI) exposure system in repeated mode" - Toxicology In Vitro 58, 110-117

Article scientifique hors cadre de la thèse :

Margheritta AL ZALLOUHA, Yann LANDKOCZ, Clémence MEAUSOONE, Frédéric LEDOUX, Fabien VISADE, Fabrice CAZIER, Perrine J MARTIN, Mireille BORGIE, Jean-Jacques VITAGLIANO, Gauthier TREMOLET, Jean-Charles CAILLIEZ, Pierre GOSSET, Dominique COURCOT, Sylvain BILLET, (2020) "A prospective pilot study of the T lymphocytes response to fine particulate matter exposure" - Journal of Applied Toxicology, DOI : 10.1002/jat.3932

Communications orales :

Clémence MÉAUSOONE, Yann LANDKOCZ, Dominique COURCOT, Sylvain BILLET (2017) "Contribution of toxicology to the development of methods for VOCs catalytic degradation and identification of by-products" 6^{ème} workshop Nord-Européen sur le traitement des COV. 23 juin 2017, Dunkerque, France.

Clémence MÉAUSOONE, Sylvain BILLET, Rebecca EL-KHAWAJA, Gauthier TREMOLET, Stéphane SIFFERT, Renaud COUSIN, Fabrice CAZIER, Dominique COURCOT et Yann LANDKOCZ « Etude de la toxicité d'effluents gazeux issus du traitement catalytique du toluène lors d'expositions répétées en Interface Air-liquide » Congrès de la Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire. 13-14 juin 2019, Paris, France.

Communications affichées :

Clémence MÉAUSOONE, Rebecca EL-KHAWAJA, Gauthier TREMOLET, stéphane SIFFERT, Renaud COUSIN, Fabrice CAZIER, Sylvain BILLET, Dominique COURCOT, Yann LANDKOCZ (2018) "In vitro toxicological evaluation of emissions from catalytic oxidation removal of industrial VOCs by air/liquid interface (ALI) exposure system in repeated exposure mode" 20th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV). 15-18 octobre 2018, Berlin, Allemagne.

Clémence MÉAUSOONE, Yann LANDKOCZ, Dominique COURCOT, Sylvain BILLET (2017) « Développement d'un modèle d'exposition cellulaire répétée aux composés organiques volatils » 3^{ème} Colloque International Francophone en Environnement et Santé. 23-25 octobre 2017, Dunkerque, France.

Clémence MÉAUSOONE, Rebecca EL-KHAWAJA, Gauthier TREMOLET, stéphane SIFFERT, Renaud COUSIN, Fabrice CAZIER, Sylvain BILLET, Dominique COURCOT, Yann LANDKOCZ (2018) "In vitro toxicological evaluation of emissions from catalytic oxidation removal of industrial VOCs by air/liquid interface (ALI) exposure system in repeated exposure mode" Congrès annuel de la Société Française de Toxicologie (SFT). 27-28 novembre 2018, Lille, France.

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	iii
Abréviations	vii
Introduction	xi
Chapitre 1 : Etat de l'art	1
1. Propriétés, réglementation et remédiation des Composés Organiques Volatils	1
1.1 Définition et caractéristiques des Composés Organiques Volatils	1
1.2 Classification des COV	3
1.3 Les émissions de COV	5
1.4 Le contexte réglementaire des COVNM	12
1.5 Les moyens de remédiation.....	14
2. Toxicologie humaine des COV	16
2.1 Toxicocinétique des COV	17
2.2 Effet des COV sur la santé.....	23
2.3 Toxicologie humaine des 4 COV d'étude	27
2.4 Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle des 4 COV d'étude	34
3. Toxicologie expérimentale des COV.....	37
3.1 Les méthodes <i>in vivo</i>	38
3.2 Le principe des 3R.....	41
3.3 Les méthodes <i>in vitro</i>	43
3.3.3 Toxicité cellulaire des COV.....	49
Objectifs de la thèse	53
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	56
1 Oxydation catalytique du toluène	56
2. Exposition des cellules BEAS-2B en Interface Air-liquide.....	58

2.1 Génération dynamique des flux de COV gazeux.....	59
3. Débitmètre massique pour composés liquides à effet Coriolis /4. Débitmètres massiques pour composés gazeux	60
2.2 Le système d'exposition en Interface Air-liquide	60
2.3 Analyses chimiques	61
2.3.1 Métrologie des flux gazeux produits par le générateur de COV	61
2.3.2 Analyse chimique des effluents d'oxydation catalytique des catalyseurs testés.....	61
3. Modèle cellulaire.....	62
3.1 Les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B	62
3.2 Conditions de culture cellulaire	63
3.4. Evaluation toxicologique	64
3.4.1 Microscopie	64
3.4.2 Evaluation de la viabilité cellulaire	64
3.4.3 Mesure de la prolifération cellulaire	65
3.4.4 Extraction de l'ADN, de l'ARN et des protéines.....	66
3.4.5 Evaluation de l'expression génique	66
3.4.6 Quantification des cytokines	69
3.5. Analyses statistiques	70
4. Optimisation des conditions de culture et d'exposition en système ALI.....	71
4.1 Concentration optimale.....	71
4.2 Conditions d'exposition en système ALI	71
Chapitre 3 : Toxicité du benzène, du toluène, du m-xylène et du mésitylène.....	74
1. Métrologie des flux de COV gazeux	74
2. Evaluation de la viabilité cellulaire.....	75
3. Activation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques	75
4. Réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B.....	79
5. Expression des mucines	81
6. Discussion.....	82

Chapitre 4 : Toxicité des effluents gazeux après traitement catalytique du toluène.....	91
1. Métrologie des flux de COV gazeux	91
2. Analyse chimique des effluents issus de l'oxydation catalytique du toluène.....	92
3. Evaluation de la viabilité cellulaire.....	94
4. Activation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques	94
5. Réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B.....	98
6. Expression des mucines	100
7. Discussion.....	101
Discussion générale.....	108
Conclusion et perspectives	114
Références Bibliographiques	118

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des COV en fonction de la température d'ébullition (Molhave et al., 1997)	2
Tableau 2 : Exemple de COV précurseurs d'ozone troposphérique (ORS IDF, 2007)	3
Tableau 3 : Familles de COV et leurs principaux composés (ADEME, 2013; Cicolella, 2008)	4
Tableau 4 : Familles de solvants organiques et leurs principaux composés (ADEME, 2013).....	5
Tableau 5 : principaux métabolites urinaires des COV (Alwis et al., 2012; Ding et al., 2009).....	22
Tableau 6 : Classification des substances cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR) de l'Union Européenne	26
Tableau 7 : Valeurs limites d'exposition professionnelle des composés étudiés	37
Tableau 9 : Comparaison des paramètres catalytiques de Pd/ γ Al ₂ O ₃ et Co ₆ Al ₂ -O aux concentrations d'oxydation totale de toluène (T ₅₀ : Température à laquelle 50 % de toluène est converti ; T ₁₀₀ : Température à laquelle 100 % de toluène est converti ; T _{exp} : Température expérimentale de réaction catalytique utilisée lors de l'exposition des cellules aux effluents, S _{BET} : surface spécifique)	56
Tableau 10 : Méthode chromatographique utilisée pour l'analyse et la quantification par GC/MS des composés piégés sur cartouche d'adsorption Tenax™	62
Tableau 11 : Programme de température de la transcription inverse.....	67
Tableau 12 : Sondes TaqMan utilisées pour la qPCR.....	67
Tableau 13 : Suivi de la concentration en COV durant l'exposition en interface air-liquide. Les résultats représentent la valeur moyenne ainsi que l'intervalle de confiance à 95%	74
Tableau 14 : Expression relative des gènes codant pour les EMX après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. L'expression des 12 gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique des C _t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation (= : aucune différence significative ; - : RQ < 0,5 ; + : RQ > 2 ; ++ : RQ > 4).....	87
Tableau 15 : Suivi de la concentration en toluène durant l'exposition en interface air-liquide. Les résultats représentent la valeur moyenne ainsi que l'intervalle de confiance à 95%	91
Tableau 16 : Concentration (en ppb) du toluène non converti et des sous-produits présents dans les effluents issus du traitement catalytique du toluène en présence du catalyseur Pd/ γ Al ₂ O ₃ (T _{exp} = 260°C) et du catalyseur Co ₆ Al ₂ -O (T _{exp} = 350°C) (<LD : sous la limite de détection)	93
Tableau 17 : Expression relative des gènes EMX après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. L'expression des 12 gènes a été	

mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation (= : aucune différence significative de l'expression ; - : RQ < 0,5 ; + : RQ > 2 ; ++ : RQ > 4) 104

Liste des figures

Figure 1 : Formules semi-développées du benzène et de ses homologues.....	5
Figure 2 : Emissions européennes des COVNM par pays en 2016 (EEA, 2019).....	6
Figure 3 : Emissions européennes des COVNM par secteur en 2016 (EEA, 2016).....	7
Figure 4 : Emissions françaises de COVNM par secteur entre 1988 et 2016 (CITEPA, 2017)	8
Figure 5 : Emissions françaises d'hydrocarbures aromatiques par secteur en 2016 (CITEPA, 2017)	10
Figure 6 : Emissions des COVNM par secteur dans les Hauts de France en 2016 (DREAL Hauts-de-France, 2016)	11
Figure 7 : Cartographie des émissions en tonnes des COVNM dans la région Hauts-de-France (DREAL Hauts-de-France, 2016).....	12
Figure 8 : Les différents procédés de remédiation des COV (Khan and Ghoshal, 2000; Le Cloirec, 2004)	14
Figure 9 : Toxicocinétique des xénobiotiques (INRS, 2012a)	17
Figure 10 : Métabolisme du benzène (inspiré de INRS, 2011d; Snyder and Hedli, 1996)	27
Figure 11 : Métabolisme du toluène (inspiré de INRS, 2012b; Woiwode et al., 1979).....	29
Figure 12 : Métabolisme du xylène (inspiré de Fishbein, 1985; INRS, 2009c)	31
Figure 13 : Métabolisme du mésitylène (inspiré de INRS, 2004).....	33
Figure 14 : Dispositifs d'exposition in vivo aux polluants atmosphériques : exposition du corps entier (A) ou exposition par voie respiratoire (B) (d'après Chen and Lippmann, 2015; Wong, 2007)	40
Figure 15 : Techniques d'exposition par intermittence à l'aide de plateaux oscillants (A) ou de bouteilles rotatives (B) (d'après Bakand and Hayes, 2010)	47
Figure 16 : Culture (1) et exposition cellulaire en Interface Air-Liquide de manière statique (2) ou dynamique (3) (d'après Aufderheide, 2008).....	47
Figure 17 : Le système d'exposition en Interface Air-liquide Vitrocell®.....	48
Figure 18 : Dispositifs d'exposition en Interface Air-liquide (A : ALICE; B : Hanging Drop; C : EAVES)	49
Figure 19 : Rôle de l'épithélium des voies pulmonaires dans la régulation des pathologies inflammatoires (Loxham et al., 2014). ROS : Reactive Oxygen Species ; UPR : Unfolded Protein Response ; T cell : lymphocyte T	50
Figure 20 : Stratégie expérimentale adoptée dans le cadre de la thèse.....	55
Figure 21 : Courbes de conversion catalytique du toluène en fonction de la température mesurée au niveau du catalyseur utilisé : Pd/ γ -Al ₂ O ₃ ou Co ₆ Al ₂ O (concentration d'entrée du toluène : 1 000 ppm). La quantité de benzène émise suivant la température de réaction en présence de chaque catalyseur est représentée en pointillés.	58

Figure 22 : Dispositif expérimental du système d'exposition des cellules en interface air-liquide au toluène, à ses homologues et aux effluents gazeux issus de son oxydation catalytique.....	58
Figure 23 : Générateur de mélanges de COV	59
Figure 24 : Module Vitrocell et illustration de l'exposition de cellules en interface air/liquide (https://www.vitrocell.com)	60
Figure 25 : Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B.....	62
Figure 26 : Conversion du pyruvate en lactate par l'enzyme Lactate Déshydrogénase (LDH).....	64
Figure 27 : Conversion de la résazurine en résorufine.....	65
Figure 28 : Nombre de cycles pour atteindre le seuil de fluorescence : Ct médian (en bleu) et Ct minimum et maximum (en noir) obtenus après amplification de 10 ng d'ARN provenant de chacune des modalités de l'étude (témoin, cellules exposées aux effluents après catalyse, cellules exposées aux COV seuls).....	68
Figure 29 : Mesure de la sécrétion relative de cytokines (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules au à 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lipopolysaccharide bactérien. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliques biologiques (n = 3) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air purifié (test U de Mann-Whitney, * p<0.05)	69
Figure 30 : Optimisation de la concentration cellulaire d'ensemencement des BEAS-2B sur insert. Observation en microscopie optique des cultures après 8 et 14 jours (grossissement x20 et x100)	71
Figure 31 : Evaluation de la cytotoxicité estimée par la mesure de l'activité extracellulaire de la Lactate Déshydrogénase (LDH) et mesure de la prolifération cellulaire par le test AlamarBlue™ des cellules BEAS-2B cultivées sur inserts exposées à l'air filtré, 1h/jour pendant 8 jours. Les valeurs obtenues chaque jour (n=3) ont été comparées aux témoins incubateur et au triton X-100 (témoin positif de mortalité). L'ajustement de la courbe-réponse a été réalisé à l'aide du modèle d'équation de Hill, afin de déterminer la concentration d'effet à 10 % (CE ₁₀).....	72
Figure 32 : Evaluation morphologique des cellules BEAS-2B à l'aide d'un microscope photonique (grossissement X100) après exposition des cellules au toluène pendant 1h et 1h/jour durant 3 et 5 jours. 72	
Figure 33 : Expression relative des EMX après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$	77
Figure 34 : Expression relative de 2 gènes de l'inflammation (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique	

<i>C_t</i> de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour RQ > 2 ou RQ < 0,5	79
Figure 35 : Mesure de la sécrétion relative des interleukines (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliquas biologiques (n = 3) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air filtré. Aucune différence statistique n'a été observée (test U de Mann Whitney ; p < 0,05)	80
Figure 36 : Expression relative de 2 gènes des mucines (MUC1 et MUC5AC) après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique <i>C_t</i> de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour RQ > 2 ou RQ < 0,5	81
Figure 37 : Chromatogrammes obtenus pour l'analyse par GC-MS des effluents gazeux après réaction en présence du catalyseur Pd/ γ Al ₂ O ₃ (A) et du catalyseur Co ₆ Al ₂ O (B)	92
Figure 38 : Expression relative de 12 EMX après exposition des cellules BEAS-2B au toluène (100 et 1000 ppm) ou aux effluents gazeux issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours (effluent non dilué (100 %) ou dilué (10 %) dans l'air filtré. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique <i>C_t</i> de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significativement différent du témoin exposé à l'air filtré pour RQ > 2 ou RQ < 0,5	96
Figure 39 : Expression relative de 2 gènes de l'inflammation (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique <i>C_t</i> de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour RQ > 2 ou RQ < 0,5	98
Figure 40 : Mesure de la sécrétion relative des interleukines (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules au toluène ou au flux gazeux après oxydation catalytique pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. Les concentrations d'interleukines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliquas biologiques (n = 3) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air filtré. Aucune différence statistique n'a été observée (test U de Mann Whitney ; p < 0,05).	98
Figure 41 : Expression relative de 2 gènes des mucines (MUC1 et MUC5AC) après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression	

des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$ 100

Abréviations

A

AASQA	Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air
ACTB	Actine β
ADH	Alcool déshydrogénase
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Arylhydrocarbon receptor
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ALI	Air-Liquid Interface
ALICE	Air-Liquid Interface Cell Exposure
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection

B

B2M	Bêta-2 microglobuline
BaP	Benzo(a)pyrène
BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium
BMA	Acide benzylmercapturique
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive

C

CEE-NU	Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CMR	Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique
COV	Composé Organique Volatil
COVB	Composé Organique Volatil Biogénique
COVNM	Composé Organique Volatil Non Méthanique
CUD	Communauté Urbaine de Dunkerque
CVF	Capacité Vitale Forcée
CYP	monooxygénase à cytochrome P450

D

DEMM	Débit Expiratoire Maximale Médian
DHDH	Dihydrodiol Déshydrogénase
DREAL	Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

E

ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EEA	European Environment Agency
ELISA	Enzyme Link Immunosorbant Assay
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
EPC	Equipement de Protection Collective
EPHX	Epoxide hydrolase
EPI	Equipement de Protection Individuelle
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EURL	European Union Reference Laboratory

F

FeNO	Fractional exhaled Nitric Oxide
------	---------------------------------

G

GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC/MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GLYAT	Glycine N-acyltransferase
GST	Glutathion S-transférase

H

hAEC	Human Alveolar Epithelial Cells
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBEC	Human Bronchial Epithelial Cells
HCNM	Hydrocarbures Non Méthaniques
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase

I

ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement
IL	Interleukine

L

LAURE Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie

M

MCP-1 Monocyte chemoattractant protein 1
MPO Myéloperoxydase
MRP Multidrug resistance protein
MTD Meilleures Techniques Disponibles
MUC Mucine

N

NAD(P)H Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAT N-acétyltransférase
NHBE Normal Human Bronchial Epithelial cells
NF- κ B Nuclear Factor-kappa B
NQO1 NAD(P)H quinone déshydrogénase 1

O

OMS Organisation Mondiale de la Santé

P

PBS Phosphate Buffer Saline
PCOP Potentiel de Création d'Ozone Photochimique
PEC Protéine Eosinophile Cationique
PGE2 Prostaglandine E2
PM Particulate Matter
ppb part per billion (partie par milliard)
ppm part per million (partie par million)

R

3R Replacement, Reduction and Refinement
REACH Registration, Evaluation, Autorisation of Chemicals
RIN RNA Integrity Number
RQ Quantification Relative
RT-qPCR Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SECTEN	SECTeurs Economiques et éNergies
SNC	Système Nerveux Central

U

UBC	Ubiquitine C
UE	Union Européenne
UGT	UDP-glycosyltransferase
uLTE4	Urine leukotriène E4

V

VEMS	Volume Expiratoire Maximale à la première Seconde
VGAI	Valeur Guide de qualité d'Air intérieur
VLCT	Valeur Limite à Court Terme
VLE	Valeur Limite d'Exposition
VLEP	Valeur Limite d'Exposition Professionnelle
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Introduction

En Europe, la pollution atmosphérique est actuellement le principal risque pour la santé, en lien avec l'environnement. En 2018, l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA) a estimé que la pollution de l'air intérieur et extérieur réduisait l'espérance moyenne de vie des européens de près de 1 an et provoquait 400 000 décès prématurés chaque année (EEA, 2018). La pollution atmosphérique a d'ailleurs été classée comme « cancérogène certain » par le Centre International de Recherche sur le Cancer (Loomis et al., 2013). Les Composés Organiques Volatils Non Méthaniques (COVNM) sont l'une des principales familles de composés présents dans l'air et identifiés par l'Union Européenne (UE) comme pouvant provoquer un effet néfaste sur la santé (Koolen and Rothenberg, 2019). En effet, l'exposition répétée à certains d'entre eux peut induire des effets cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques, causer des réactions allergiques et des irritations, ou encore des troubles de la vision et de la mémoire. Les COV sont également précurseurs de la formation de l'ozone troposphérique (O_3), composé très oxydant qui possède des effets néfastes sur la santé comme l'irritation des yeux et des voies respiratoires.

Les composés volatils peuvent être d'origine biogénique (forêts, cultures, et organismes photosynthétiques, par exemple) ou être émis par les activités humaines (industrie, agriculture, transport routier, par exemple). Cependant, dans les zones industrialisées et urbaines, les émissions d'origine anthropique contribuent majoritairement aux concentrations de COV mesurées dans l'air ambiant. En Europe, le premier secteur émetteur est celui de l'industrie avec 48 % des émissions totales en COVNM (EEA, 2018). Avec une production et une importation annuelle comprise entre 1 et 10 millions de tonnes, le toluène est l'un des COV régulièrement utilisé comme solvant dans de nombreux procédés industriels tels que la fabrication et l'utilisation de peinture, l'impression, la fabrication de chaussures ou encore l'industrie automobile. Pourtant ses effets néfastes sur l'Homme sont connus. En effet, le toluène fait l'objet d'un classement reprotoxique de catégorie 2 par l'UE et de nombreuses études ont mis en évidence sa toxicité neurosensorielle, en provoquant des troubles de l'audition et de la perception visuelle (Chang et al., 2006; Kobald et al., 2015). Enfin, l'apparition de troubles ventilatoires comme l'asthme peut être en lien avec une exposition au toluène (Hulin et al., 2010).

Les émissions industrielles en COV, tels que le toluène, n'ont pas uniquement un impact local mais aussi un impact à plus longue distance. Leur réduction est donc une préoccupation majeure. Grâce à une législation renforcée et une surveillance rigoureuse, une diminution des émissions de ces polluants a déjà été observée depuis les années 1980 (EEA, 2018). Toutefois, leur présence dans l'atmosphère est encore élevée. Les

industries doivent donc envisager parmi plusieurs solutions afin de diminuer leurs rejets de COV et pour respecter les valeurs limites réglementaires. Le premier levier d'action correspond au principe de substitution évoqué dans le règlement européen REACH (1907/2006). Il consiste à remplacer les molécules toxiques par des composés moins nocifs pour la santé humaine et pour l'environnement, quand le procédé industriel le permet. Lorsque la substitution n'est pas réalisable pour des raisons économiques ou techniques, des méthodes de remédiation peuvent être utilisées afin de récupérer ou de détruire les composés présents dans des effluents gazeux avant leur rejet dans l'atmosphère. L'une des méthodes utilisées est l'oxydation catalytique. Cette dernière consiste en l'oxydation totale des composés organiques volatils en H₂O et CO₂. Par contre, en fonction du matériau catalytique et de la molécule à traiter, des sous-produits potentiellement toxiques peuvent se former pendant les réactions, ce qui pourrait induire des effets néfastes en cas de rejets dans l'atmosphère.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est d'évaluer les effets toxiques induits par une exposition aiguë et répétée de cellules épithéliales bronchiques humaines au toluène, composé organique volatil régulièrement retrouvé dans les atmosphères de travail. Par ailleurs, afin de diminuer son rejet dans l'air, nous avons étudié la possibilité de substituer le toluène par l'un de ses homologues et/ou de réduire ses émissions à la source grâce à l'oxydation catalytique. Pour cela, la toxicité de ses homologues supérieurs pouvant être utilisés comme composés de substitution, ainsi que de son homologue inférieur pris comme molécule de référence a été étudiée. Dans un deuxième temps, le potentiel toxique des effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène a été évalué.

Cette recherche s'inscrit dans la continuité de projets européens déjà réalisés au sein de l'équipe Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques du laboratoire UCEIV. D'un point de vue fondamental, ces expérimentations permettent de mieux comprendre la toxicité de COV fréquemment utilisés dans l'industrie et d'identifier les voies métaboliques qu'ils peuvent altérer. D'un point de vue santé environnementale, l'étude de ces substances est indispensable pour évaluer les dangers encourus par leur exposition afin de limiter, voire interdire leur utilisation. Enfin sur le plan applicatif, ces travaux contribuent au développement de méthodes de remédiation plus respectueuses de la santé.

Ce manuscrit est divisé en 4 chapitres :

- Le premier chapitre correspond à un état de l'art sur les émissions des Composés Organiques Volatils en France et en Europe, leurs propriétés, les législations les concernant ainsi que les moyens de remédiation pouvant être utilisés. Puis l'impact des COV et plus particulièrement, celui du toluène et de ses homologues sur la santé humaine est développé. Pour finir, une synthèse des différentes

méthodes toxicologiques pouvant être utilisées pour l'évaluation des effets des composés gazeux sera présentée.

- Le deuxième chapitre détaille les méthodes expérimentales utilisées pour les analyses chimiques, les tests de catalyseurs et la mesure des paramètres de toxicité. Les conditions de culture et d'exposition cellulaire y sont également développées.
- Le troisième chapitre présente les résultats et la discussion des tests toxicologiques réalisés sur le benzène, le toluène, le m-xylène et le mésitylène. L'objectif est de comparer l'effet de ces 4 COV sur les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B.
- Le quatrième chapitre concerne les résultats d'analyse chimique et de l'évaluation d'effets toxiques des effluents obtenus après oxydation catalytique du toluène. Les observations seront suivies d'une discussion.
- Enfin, le manuscrit s'achève sur une discussion générale suivie par une conclusion et des perspectives.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Ce premier chapitre composé de trois parties a pour objectif de situer le contexte général du projet de thèse. Dans la première partie, la définition et la classification des « Composés Organiques Volatils » (COV) sera présentée avant d'aborder leurs origines et leurs principales sources d'émission. Compte tenu de leur impact sur l'Environnement et la santé, la réglementation sur les COV sera rappelée notamment celle liée à leur utilisation et limites d'émissions, pour enchaîner ensuite sur la présentation des moyens de remédiation. La deuxième partie sera consacrée à l'effet des COV sur la santé humaine et plus spécifiquement l'effet des 4 molécules étudiées dans ce travail à savoir, le benzène, le toluène, le xylène et le mésitylène. Enfin, le dernier volet de ce chapitre présentera les différentes méthodes utilisées en toxicologie expérimentale en détaillant les approches *in vivo* et *in vitro*.

1. Propriétés, réglementation et remédiation des Composés Organiques Volatils

1.1 Définition et caractéristiques des Composés Organiques Volatils

Les Composés Organiques Volatils regroupent des molécules chimiques ayant comme point commun d'être volatiles à température ambiante. Toutefois, en fonction des pays et de leur législation respective, différents critères physiques et chimiques sont utilisés pour les définir.

La France est l'un des premiers pays européens à avoir attribué une définition aux COV, avant même l'apparition de la réglementation européenne. Cette définition est inscrite dans l'arrêté du 2 février 1998¹, concernant les Installations Classées pour la Protection de l'Environnement (ICPE) et distingue les composés organiques volatils en fonction de leur pression de vapeur saturante. Par la suite, l'Europe a repris cette définition dans la directive n°1999/13/CE², en y précisant le terme « composé organique ». Ainsi, les composés organiques désignent « *tout composé contenant au moins l'élément carbone et un ou plusieurs des éléments suivants : hydrogène, halogène, oxygène, soufre, phosphore, silicium et azote, à l'exception des oxydes de carbone et des carbonates et des bicarbonates inorganiques* ». Les COV sont définis en tant que « *composés organiques, à l'exclusion du méthane, ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus, à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières* ». Les solvants organiques, COV couramment utilisés et émis par les industries, y sont également

¹ Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation.

² Directive 1999/13/CE du Conseil européen du 11 mars 1999 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations.

mentionnés comme « *Tout COV utilisé seul ou en association avec d'autres agents, sans subir de modification chimique, pour dissoudre des matières premières, des produits ou des déchets, ou utilisé comme solvant de nettoyage pour dissoudre les salissures, ou comme dissolvant, dispersant, correcteur de viscosité, correcteur de tension superficielle, plastifiant ou agent protecteur* ».

Il faut préciser que le méthane, malgré ses caractéristiques proches des autres composés organiques volatils, est exclu de la législation française. En effet, ce composé n'est pas associé aux mêmes lois en raison de sa présence naturelle dans l'environnement et de son rôle dans l'effet de serre. Ainsi, le terme générique de COV est souvent utilisé pour désigner plus spécifiquement les Composés Organiques Volatils Non Méthaniques (COVNM) ou Hydrocarbures Non Méthaniques (HCNM).

Les composés organiques volatils peuvent être classés d'après leur température d'ébullition (Molhave et al., 1997). Cette classification est divisée en 3 catégories, décrites dans le tableau 1. D'après ce critère physique, un COV est une molécule dont la température d'ébullition est comprise entre 50 et 260°C à la pression standard de 101,3 kPa.

Tableau 1 : Classification des COV en fonction de la température d'ébullition (Molhave et al., 1997)

Catégories	Température d'ébullition (°C)
Composés Organiques Très Volatils	< [50 – 100°C]
Composés Organiques Volatils	[50 – 100°C] à [240 - 260°C]
Composés Organiques Semi Volatils	[240 à 260°C] à [380 - 400°C]

Toutefois, ces définitions ne prennent pas en compte les caractéristiques chimiques des COV, telles que leur rôle de précurseur de l'ozone troposphérique. En effet, les COV rejetés dans l'atmosphère et en présence d'oxydes d'azote participent à des réactions photochimiques complexes qui se traduisent par une augmentation de la concentration d'ozone dans la troposphère (Seinfeld and Pandis, 2006). Validé en décembre 1999 dans le cadre de la Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies (CEE-NU), le protocole de Göteborg³ propose donc la définition suivante : « *on entend par composés organiques volatils, tous les composés organiques provenant de sources anthropiques et biogènes autres que le méthane, capables de produire des oxydants photochimiques par réaction avec des oxydes d'azote sous l'effet du rayonnement solaire* ». Par la suite, il a été tenu compte de cette définition dans les directives européennes

³ Protocole de Göteborg à la convention de 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance relatif à la réduction de l'acidification, de l'eutrophisation et de l'ozone troposphérique.

2001/81/CE⁴ et 2002/3/CE⁵ afin de fixer une liste des composés organiques jouant un rôle dans la génération de l’ozone troposphérique. Ces molécules sont classées en 4 catégories (tableau 2), en fonction de leur Potentiel de Création d’Ozone Photochimique (PCOP). L’indice PCOP permet de classer les COVNM en fonction de leur contribution relative dans la formation de l’ozone troposphérique. La molécule de référence utilisée pour calculer les PCOP est l’éthylène avec un indice PCOP de 100. Ce composé a été défini comme référence car il est l’un des COV les plus impliqués dans les processus photochimiques et ses concentrations dans l’air ambiant sont bien connues.

Tableau 2 : Exemple de COV précurseurs d’ozone troposphérique (ORS IDF, 2007)

Catégories	PCOP	Exemples de COV
Pouvoir élevé	> 80	éthylène, m-xylène
Pouvoir moyen	40 à 60	toluène, formaldéhyde
Pouvoir faible	10 à 35	benzène, éthanol
Pouvoir très faible	< 10	éthane

1.2 Classification des COV

Le groupe des composés organiques volatils est constitué d’une multitude de substances organiques, pouvant appartenir à 4 grandes familles chimiques divisées en plusieurs sous-familles (tableau 3) :

- Les hydrocarbures saturés, tel que les alcanes, et les hydrocarbures insaturés, comme les alcènes et les alcynes, composent la famille des **hydrocarbures aliphatiques**. Ils sont largement employés en tant que solvants pour la peinture, les vernis et les laques mais également comme intermédiaires de synthèse et agents dégraissants (INRS, 2011a).
- Les **hydrocarbures alicycliques** sont dérivés des hydrocarbures aliphatiques. Les 3 groupes appartenant à cette famille sont les cycloalcanes, les cycloalcènes et les terpènes. Ces molécules rentrent dans la composition des colles, des adhésifs, des peintures, des produits d’entretien et des parfums (INRS, 1999). Les terpènes, tels que le camphre ou l’ α -pinène, sont des composés présents naturellement dans de nombreux végétaux.
- Les **hydrocarbures substitués** ne sont pas uniquement composés d’atomes de carbone et d’hydrogène. En effet, ces derniers peuvent être remplacés par des atomes halogénés (brome, fluor, chlore et iode) ou par un groupement fonctionnel hydroxyle (-OH) formant respectivement le groupe des halogènes et des alcools. Les aldéhydes, les cétones, les éthers et les esters, les acides et les dérivés aminés sont également des composés appartenant à cette famille de COV. Compte tenu de leur composition

⁴ Directive n° 2001/81/CE du 23/10/01 sur les plafonds d’émission nationaux pour certains polluants atmosphériques.

⁵ Directive n° 2002/3/CE du 12/02/02 relative à l’ozone dans l’air ambiant.

chimique hétérogène, leurs domaines d'application sont variés (solvant, intermédiaire de synthèse, agents de solubilisation,...) (INRS, 2009a, 2009b, 2011b, 2011c).

- Les **hydrocarbures aromatiques** sont essentiellement utilisés comme solvants organiques dans l'industrie. Elle est divisée en 2 sous-familles : les hydrocarbures aromatiques monocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques regroupent toutes les molécules ayant pour base le noyau benzénique et possédant un ou plusieurs substituants, comme dans le cas du toluène, des xylènes (diméthylbenzène) et du mésitylène (1,3,5-triméthylbenzène) (figure 1). Ces espèces organiques présentent des caractéristiques communes telles que leur volatilité à température ambiante mais possèdent des propriétés toxicologiques propres à chaque substance. La volatilité des molécules est liée à leur pression de vapeur saturante. A 20°C, la pression de vapeur du benzène, du toluène, du m-xylène et du mésitylène est respectivement de 9,9, 3,0, 0,9 et 0,2 kPa.

Tableau 3 : Familles de COV et leurs principaux composés (ADEME, 2013; Cicoletta, 2008)

Familles chimiques	Principaux composés
Hydrocarbures aliphatiques :	
Alcanes	propane, butane, pentane
Alcènes	propène, butadiène, pentène
Alcyne	propyne ou méthylacétylène, 1-butyne
Hydrocarbures alicycliques :	
Cycloalcanes	cyclopropane, cyclobutane, cyclopentane
Cycloalcènes	cyclopropène, cyclobutène, cyclopentène
Terpènes	limonène, pinène, camphre
Hydrocarbures aromatiques :	
Hydrocarbures aromatiques monocycliques	benzène, toluène, xylène, mésitylène
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	anthracène, benzo(a)pyrène, naphthalène
Hydrocarbures substitués :	
Halogénés	chloroforme, chlorobenzène
Alcools	méthanol, éthanol, propanol
Aldéhydes	formaldéhyde, acétaldéhyde
Cétones	acétone, méthyléthylcétone
Ethers et esters	éther de glycol, acétate de méthyle
Acides	acide formique, acide acétique
Dérivés aminés et nitrés	acrylonitrile, éthylamine

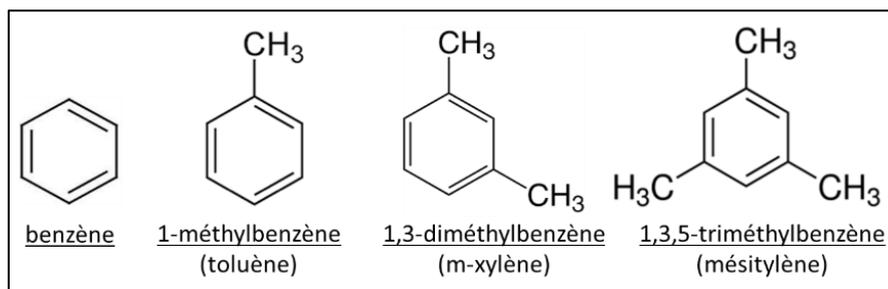


Figure 1 : Formules semi-développées du benzène et de ses homologues

Les COV peuvent également être classés en fonction de leur application industrielle. En effet, les industries ont souvent recours à ces substances en tant que solvant, dégraissant, agent de synthèse, etc. Les solvants organiques sont utilisés dans une vingtaine de secteurs industriels, comme par exemple l'imprimerie ou l'industrie automobile (CITEPA, 2017), qui font partie des émetteurs principaux de COV dans l'atmosphère. Ces solvants peuvent être classés en 3 familles, répertoriées dans le tableau suivant (tableau 4).

Tableau 4 : Familles de solvants organiques et leurs principaux composés (ADEME, 2013)

Solvants	Principaux composés
Solvants oxygénés	alcools, cétones, esters
Solvants halogénés	dichlorométhane, trichloroéthylène
Solvants pétroliers	benzène, toluène, isopropylbenzène (cumène)

1.3 Les émissions de COV

Les sources d'émission des COV sont nombreuses. Elles peuvent être anthropiques, c'est-à-dire dues aux activités humaines, ou d'origine biogénique, provenant d'émissions naturelles. Dans l'atmosphère, les molécules peuvent avoir un impact sur l'environnement et la santé en tant que polluant primaire (composé n'ayant pas subi de transformation dans l'atmosphère) ou secondaire (composé formé dans l'atmosphère).

1.3.1 Les émissions d'origine anthropique

En 2018, l'EEA (European Environment Agency) a publié un rapport sur la qualité de l'air en Europe (EEA, 2018). Les chiffres communiqués concernent les polluants atmosphériques suivants : particules en suspension (Particulate Matter < 10 µm, PM₁₀ et < 2,5 µm, PM_{2,5}), SO₂ (dioxyde de soufre), NO_x (oxydes d'azote), NH₃ (ammoniac), CO (monoxyde de carbone), CH₄ (méthane) et COVNM. Entre les années 2000 et

2016, une diminution significative des émissions a été enregistrée (SO_2 : -76 % ; CO : -45 % ; COVNM : -40 % ; NO_x : -40 % ; PM_{10} : -25 % ; CH_4 : -25 % ; NH_3 : -9 %), contrastant avec l'augmentation du produit intérieur brut de l'Union Européenne (UE). Cette baisse est en partie due à un renforcement des législations et à une amélioration des technologies. Concernant les composés organiques volatils, près de 8 000 Gg de COVNM ont été émis en Europe en 2016 (EEA, 2019). L'Allemagne et la Turquie sont les pays les plus émetteurs avec plus de 1 000 Gg de COVNM émis en 2016. En revanche, avec respectivement 7 et 31 Gg de composés organiques volatils émis, l'Islande et la Slovénie sont les plus petits contributeurs européens (figure 2). En ce qui concerne les émissions françaises, 608 Gg de COVNM ont été émis en 2016, représentant environ 7,6 % des émissions européennes (EEA, 2019). La part relative des principaux secteurs émetteurs est présentée dans la figure 3. Le premier secteur est celui de l'industrie avec près de la moitié des émissions totales en composés organiques volatils, soit 48 %. Le secteur résidentiel et tertiaire (17 %), l'agriculture (13 %) et l'énergie (11 %) sont également des secteurs émetteurs prédominants. Enfin, les transports et le secteur des déchets contribuent respectivement à 10 % et 1 % des émissions de COV à l'échelle européenne.

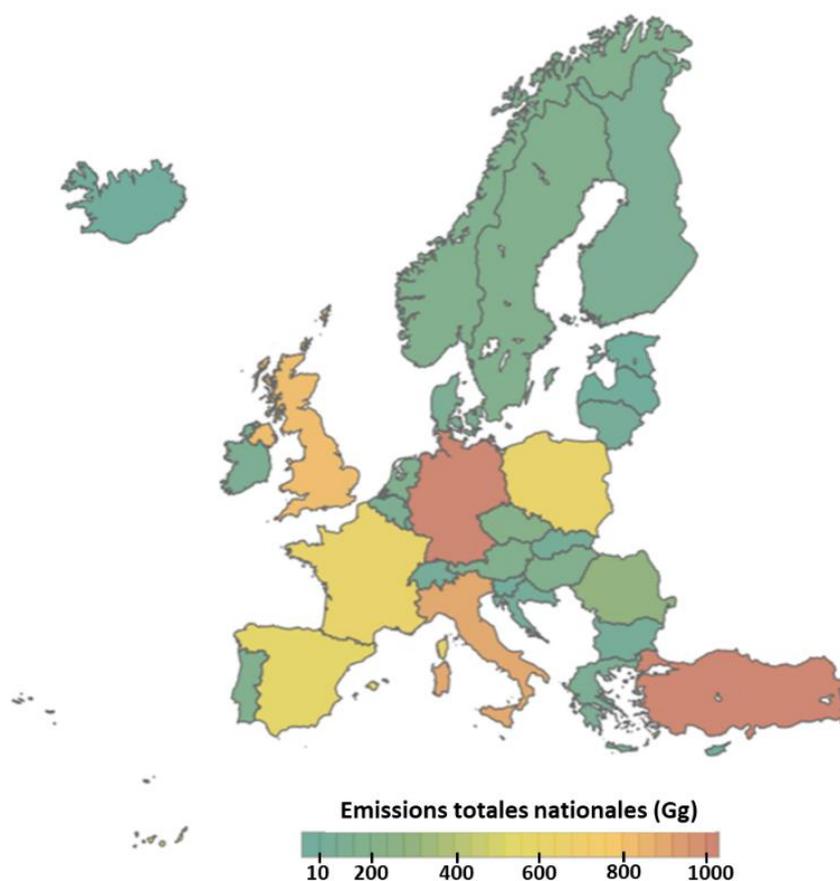


Figure 2 : Émissions européennes des COVNM par pays en 2016 (EEA, 2019)

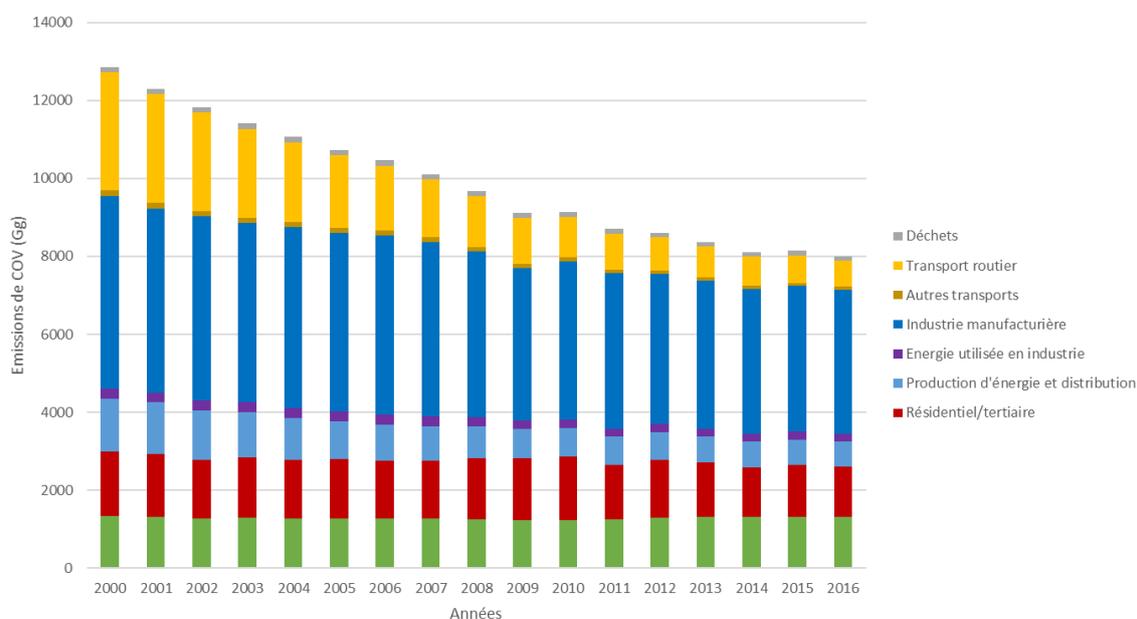


Figure 3 : Emissions européennes des COVNM par secteur en 2016 (EEA, 2016)

En France, le CITEPA (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique) est une association dont l'un des objectifs est de recenser les émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre (CITEPA, 2017). Les données recueillies depuis 1988 sont compilées dans l'inventaire SECTEN (SECTeurs Economiques et éNergies). L'année 1988 a été choisie pour le premier recensement des COVNM en France car elle correspond à l'année de référence du premier protocole de réduction des émissions des COV. En effet, le protocole de Genève a fixé en 1991 un objectif de réduction de 30 % des COV entre 1988 et 1999. Les valeurs d'émission de polluants sont présentées en fonction des différents secteurs économiques. Ainsi, 6 principaux secteurs d'activités sont répertoriés, divisés eux-mêmes en plusieurs sous-secteurs :

- le transport routier ;
- les modes de transport autres que routiers ;
- l'industrie manufacturière, le traitement des déchets et la construction ;
- le résidentiel, le tertiaire, le commercial et l'institutionnel ;
- l'agriculture, la sylviculture et l'aquaculture ;
- l'énergie.

Les émissions d'origine naturelle, biotique et celles issues du transport international sont dans un 7^{ème} secteur dit « hors total ». Leurs valeurs sont recensées mais sont exclues du total national, en accord avec les spécifications internationales.

La figure 4 présente l'évolution des émissions françaises annuelles de COVNM entre 1988 et 2016, pour les 6 secteurs retenus dans le total national (CITEPA, 2017). Cette figure montre une diminution continue des émissions de COV durant cette période, mais qui semble se stabiliser ces dernières années. Au global, une diminution de 74 % des émissions nationales de COVNM a été enregistrée sur la période 1988-2016, en considérant les émissions qui atteignaient près de 2444 kT en 1998, contre 628 kT en 2016. Cette tendance a été suivie pour tous les secteurs d'activité grâce à la mise en place de réglementations fortes et aux progrès scientifiques et technologiques (ADEME, 2013). Pour autant, un changement a été observé dans la répartition des émissions de COV par secteur d'activité entre 1988 et 2016. Ainsi, le secteur transport routier est passé de 1^{er} à 3^{ème} secteur le plus émetteur grâce à une réduction de sa part relative d'émissions de 39 % à 8 %. En revanche, une augmentation significative de la part relative des émissions du secteur résidentiel et tertiaire (+ 20 %) et du secteur industrie manufacturière (+ 12 %) a été recensée sur la même période.

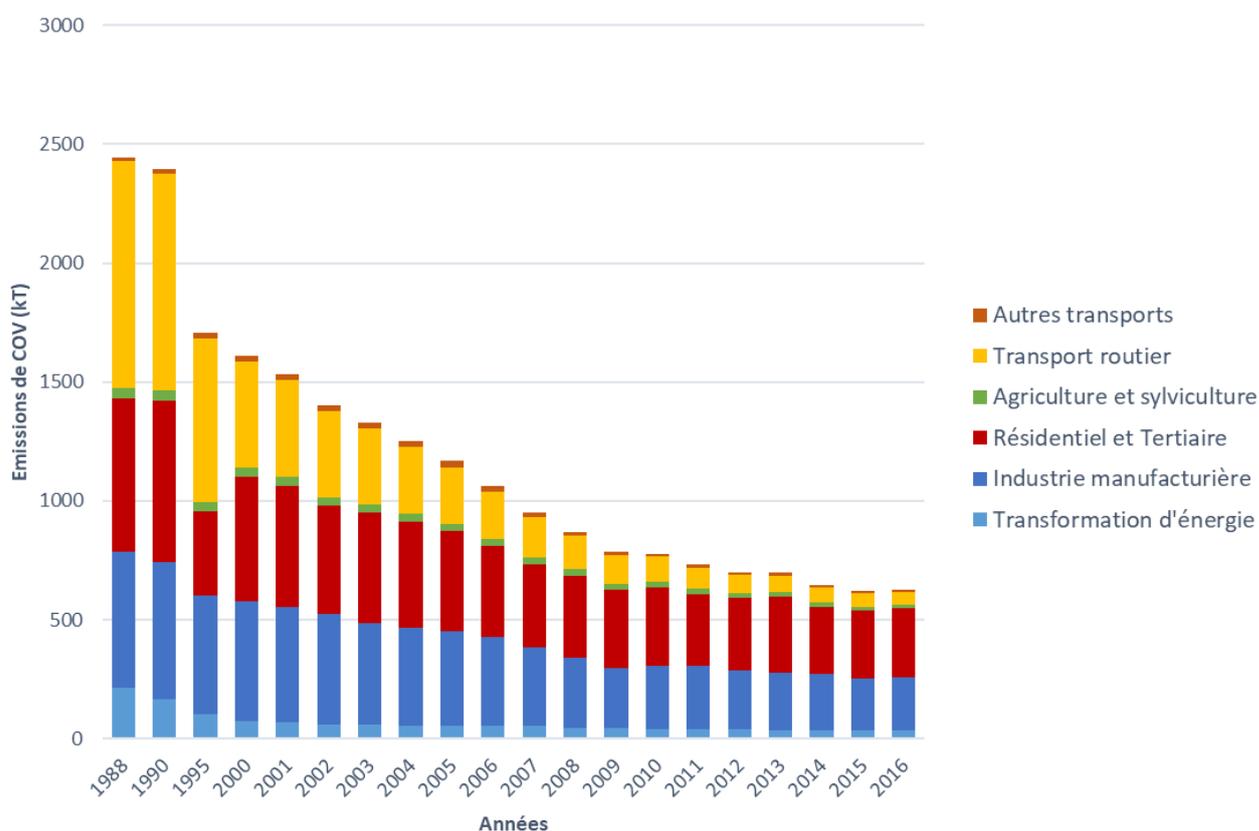


Figure 4 : Emissions françaises de COVNM par secteur entre 1988 et 2016 (CITEPA, 2017)

Dans l'inventaire des émissions pour l'année 2016 établi par le CITEPA, il apparaît que le **secteur résidentiel et tertiaire** est le premier secteur émetteur de COV avec une part relative d'émissions de 46 %. Les émissions proviennent principalement des équipements de chauffage domestique et urbain ainsi que de l'utilisation de solvants domestiques, tels que les désodorisants, les nettoyeurs ménagers et les dissolvants. L'**industrie manufacturière** serait responsable en France, de 35 % des émissions de COV dont 47 % provenant de l'utilisation de solvants (CITEPA, 2017). Ses principaux sous-secteurs émetteurs sont la construction, les autres industries manufacturières (travail du bois, peintures et imprimerie), la chimie et l'agro-alimentaire. Une forte diminution des émissions a également été enregistrée pour ce secteur avec 351 kT de rejet en moins depuis 1988. Cette baisse est due en partie, à de nouvelles législations plus strictes, à la mise en place de dispositifs de réduction des émissions ou encore à la substitution des produits toxiques par des produits à faible teneur en solvant (ADEME, 2013). En troisième position, le secteur **transport routier** représente en 2016, 8 % des émissions françaises de COV. Ces dernières peuvent provenir de sources mobiles (gaz d'échappement) ou de sources fixes (station-service). En 1993, l'obligation d'installer des pots catalytiques sur les voitures essence, puis en 1997 pour les moteurs diesel a permis une réduction de près de 30 % des émissions de COVNM pour ce secteur. Enfin, le **secteur de la transformation et de l'énergie, l'agriculture** et les **autres transports** contribuent respectivement à hauteur de 5 %, 3 % et 2 % aux émissions de COV à l'échelle nationale.

Pour chacun des secteurs d'activité, un inventaire des émissions par famille chimique a également été réalisé par l'organisation CITEPA. 21 familles de composés organiques ont ainsi été recensées. Pour l'ensemble des secteurs, les familles de COVNM les plus représentées sont les alcanes, les alcools, les aromatiques et les alcènes (ADEME, 2013). La figure 5 présente les émissions françaises d'hydrocarbures aromatiques en fonction du secteur d'activité pour l'année 2016. Ainsi, le secteur de l'industrie manufacturière est le premier secteur émetteur en France avec 43 % des émissions totales, suivi par le secteur résidentiel et tertiaire et le transport routier avec respectivement 31 % et 16 % des émissions. Comparativement, l'agriculture (5 %), la transformation d'énergie (4 %) et le traitement des déchets (1 %) sont moins émetteurs d'hydrocarbures aromatiques que les autres secteurs.

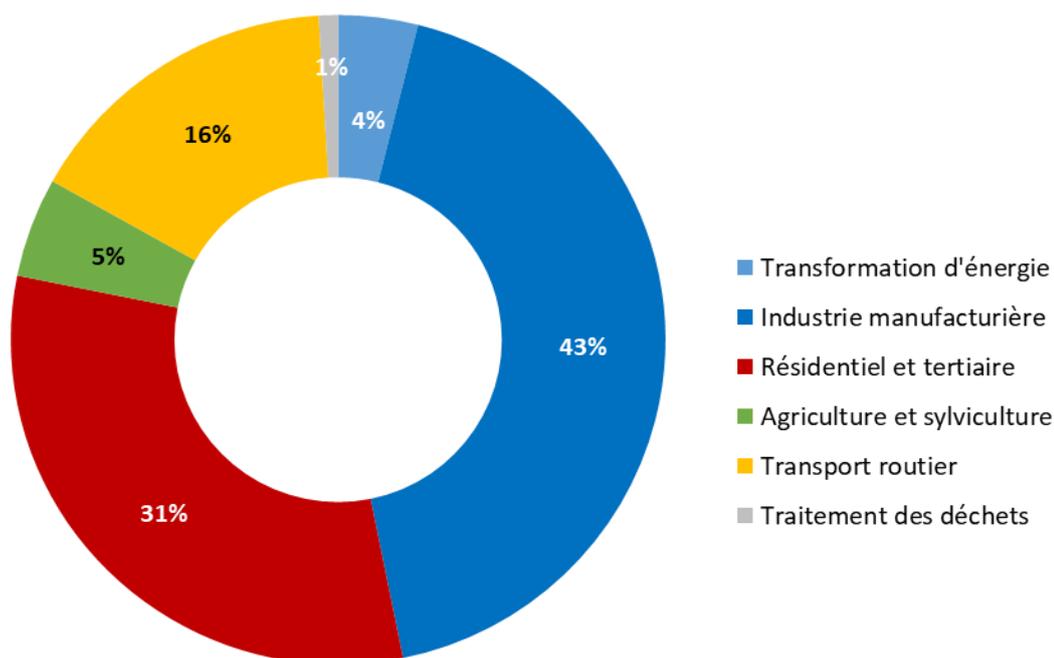


Figure 5 : Emissions françaises d'hydrocarbures aromatiques par secteur en 2016 (CITEPA, 2017)

1.3.2 Les émissions d'origine biogénique

Les composés organiques volatils biogéniques ou COVB proviennent des activités biologiques terrestres (forêts et cultures) et marines (organismes photosynthétiques). Les principales molécules émises par les sources terrestres sont les terpènes, tels que l' α - et le β -pinène, le camphène, le 3-carène ou le limonène de la famille des monoterpènes et l'isopropène appartenant au groupe des hémiterpènes (Baghi, 2013; Baudic, 2017). En revanche, les océans produisent principalement des composés oxygénés, comme le propanal, l'acétaldéhyde et l'acétone (Singh et al., 2003). Les concentrations en COVB dans l'air ambiant ne sont pas homogènes au cours des saisons puisque leurs émissions dépendent de facteurs biotiques (métabolisme des organismes et physiologie végétale) et abiotiques (radiations solaire et température ambiante). Ainsi, ces COV sont davantage émis en journée et au cours du printemps et de l'été (Baudic et al., 2016).

1.3.3 Les émissions de COV en région Hauts-de-France

Les émissions industrielles de composés organiques volatils non méthaniques dans les Hauts-de-France sont recensés chaque année par la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL). Les valeurs disponibles les plus récentes datent de 2016 et sont présentées sur la figure 6. Les principaux secteurs émetteurs dans la région des Hauts-de-France en 2016 sont :

- **l'industrie de la chimie, parachimie et pétrole** avec une part relative d'émissions de 43 % ;
- le **secteur de la mécanique et du traitement de surface** représentant 23 % des émissions totales ;
- le **secteur de la sidérurgie et de la métallurgie** avec 17 % des émissions de la région ;
- les **secteurs agro-alimentaires et boissons**, d'une part et **bois, papiers et cartons**, d'autre part sont les 4^{ème} et 5^{ème} plus gros émetteurs avec respectivement 5 et 4 % des émissions totales ;
- Avec une part relative d'émissions inférieures à 2 %, les **secteurs de l'impression, de la fabrication de verre et produits minéraux** sont en 6^{ème} et 7^{ème} position.

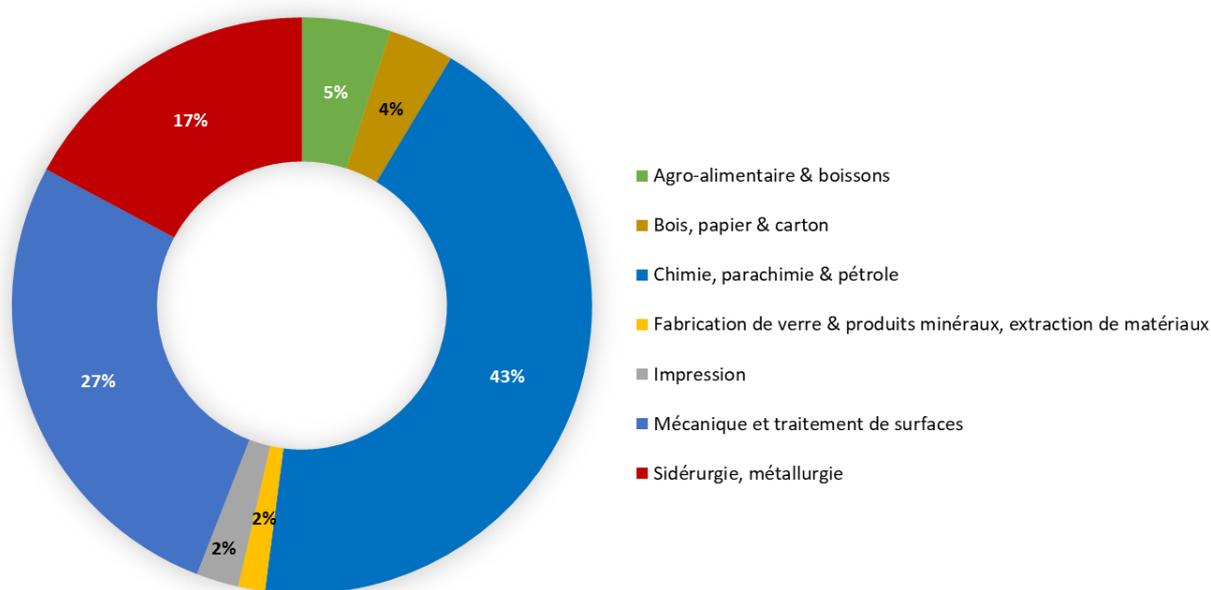


Figure 6 : Emissions des COVNM par secteur dans les Hauts de France en 2016 (DREAL Hauts-de-France, 2016)

Comme pour l'ensemble de la France, les émissions de COV totaux ont diminué en région Hauts-de-France au fur et à mesure du temps, passant de 12 000 à 10 000 tonnes entre 2011 et 2016. Cette diminution correspond à une diminution de 16 % (DREAL Hauts-de-France, 2016). A l'échelle géographique de la région, la communauté urbaine de Dunkerque (CUD) fait partie des territoires les plus émetteurs de COV, avec plus de 600 tonnes émises en 2016 (figure 7). La CUD, située le long de la mer du Nord, forme un territoire d'environ 300 km² réparti sur 17 communes. Sa population compte près de 200 000 habitants. Le grand port maritime de Dunkerque est le 3^{ème} port français et le 88^{ème} port mondial pour le trafic général. De plus, il appartient à la Northern Range correspondant au regroupement des principaux ports européens alignés le long de la mer du Nord et permettant un vaste échange commercial entre la France, la Belgique, les Pays-Bas, l'Allemagne et l'Angleterre. Ainsi, tirant profit de la situation géographique de la CUD, une vaste zone industrielle s'est développée sur le territoire. Les industries implantées sur cette zone industrielle d'environ 7 000 hectares, sont spécialisées dans le domaine énergétique, métallurgique et sidérurgique. Parmi ces entreprises, 15 sites sont classés SEVESO de haut seuil, présentant donc des risques d'accidents majeurs.

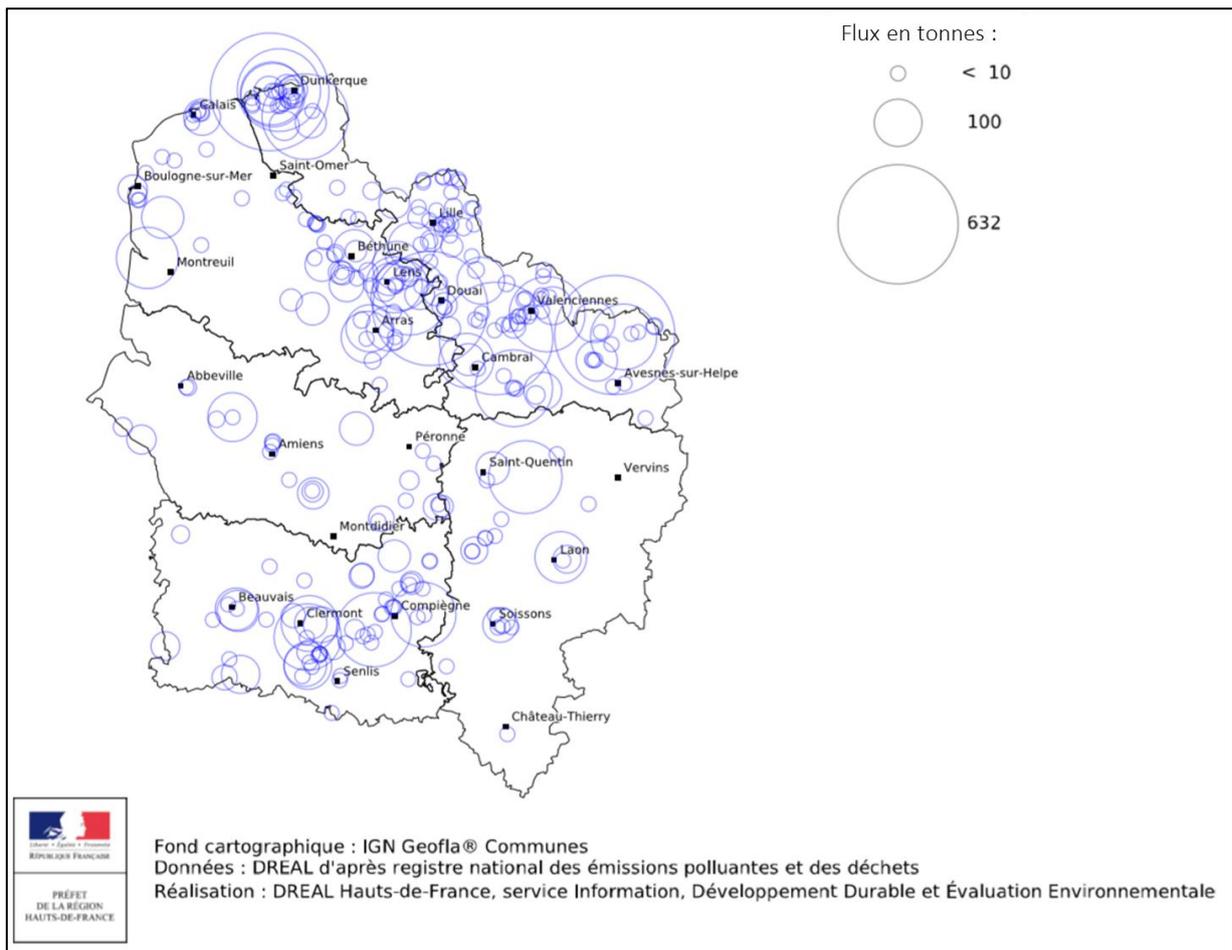


Figure 7 : Cartographie des émissions en tonnes des COVNM dans la région Hauts-de-France (DREAL Hauts-de-France, 2016)

1.4 Le contexte réglementaire des COVNM

Les années 1980 ont marqué le début d'une prise de conscience, de la part des autorités et de la population, de l'impact des COV sur l'environnement et sur l'Homme. Le premier constat concernait le rôle des COV dans la formation de l'ozone troposphérique. Ainsi dès 1985, plusieurs actions internationales sur le stockage des hydrocarbures et l'utilisation des solvants ont été mises en place (ADEME, 2013). Par la suite, des démarches collectives des Etats membres de l'Union Européenne ont abouti à différents protocoles internationaux et directives. Ces actions et démarches sont présentés ci-après.

Deux protocoles internationaux ont ainsi été élaborés afin de lutter contre les émissions de COV :

- Le **protocole de Genève** du 18 novembre 1991 concerne la lutte contre les émissions de plusieurs polluants et leurs flux transfrontaliers. Parmi les différentes actions mises en place, ce traité propose une recherche axée sur les produits et sur la modification des procédés (substitution des molécules toxiques, récupération et destruction). Il impose également aux pays une baisse de 30 % de leurs émissions en COV entre 1988 et 1999.

- Le **protocole de Göteborg** du 1^{er} décembre 1999, également appelé « multi-polluants/multi-effets », est relatif à la réduction de l'acidification, de l'eutrophisation et de la production d'ozone. Il concerne essentiellement les polluants SO₂, NO_x, COV et NH₃ et s'intéresse à leurs effets sur l'environnement et la santé. Ainsi, des objectifs de qualité de l'air et des valeurs limites ont été fixés par l'UE aux pays européens pour l'horizon 2020. Pour la France, le plafond d'émissions de COV est fixé à 702 kt par an, soit une diminution de 43 % par rapport à 2005. Toutefois, d'après les valeurs recensées par l'association CITEPA, cet objectif a déjà été atteint. En effet, la concentration en COV émis en 2016 était de 628 kt (CITEPA, 2017).

Au niveau européen, la réglementation actuelle sur les COV se compose de 4 directives et un règlement. L'objectif de cette réglementation, adoptée par la commission européenne, est d'harmoniser les législations entre les états de l'Union Européenne :

- La **directive 1996/62/CE** dite « Integrated Pollution Prevention and Control » est relative à la prévention et à la réduction intégrées de la pollution. Cette réglementation concerne les règles d'autorisation et de contrôle des installations industrielles fortement polluantes, telles que les industries minérales et chimiques, les activités énergétiques ou les installations de gestion des déchets. Afin d'aider les 52 000 industries européennes concernées, la commission européenne a élaboré des documents consignant les « meilleures techniques disponibles » (MTD) pour chacun des secteurs concernés.
- La **directive 2001/81/CE** dite « National Emission Ceilings » est la transposition européenne du protocole de Göteborg, avec la mise en place de plafonds d'émissions nationaux pour les polluants atmosphériques tels que les COV. Ainsi, chaque état membre a pour obligation de mettre en place des programmes de réduction de leurs émissions pour 2020.
- La **directive 2004/42/CE** est relative aux émissions de COV liées à l'utilisation de solvants organiques. Elle concerne les activités industrielles contribuant à la formation de polluants photochimiques due à l'utilisation de peintures, de vernis et de produits de retouche des véhicules.
- La **directive 2010/75/UE** dite « Industrial Emissions Directive » correspond à la reprise de 7 anciennes directives, dont la directive 1999/13/CE relative à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations. Ses principaux objectifs sont l'amélioration des documents consignant les MTD, ainsi qu'un meilleur suivi du respect des plafonds d'émission.
- Le **règlement REACH** (Registration, Evaluation, Autorisation of Chemical products) n°1907/2006 du 18 décembre 2006 est relatif à l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques. Elle

a pour objectif de mieux connaître la nocivité pour la santé humaine et l'environnement des produits chimiques produits ou importés dans l'UE.

La réglementation française correspond à une transposition en droit français des directives européennes :

- La **Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE)** est une loi-cadre ratifiée en 1996. Elle a pour objectif d'élaborer plusieurs outils de modélisation et de prévision de la pollution atmosphérique, pour une meilleure qualité de l'air. Elle a également permis une meilleure information du public et une meilleure gestion des Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA).
- L'**arrêté ministériel du 2 février 1998** concerne les installations classées pour la protection de l'environnement et soumises à autorisation. Ce texte contient 3 notions indispensables aux entreprises pour la diminution de leurs rejets de COV : les références de valeurs limites d'émissions (VLE) à respecter pour la mise en œuvre du plan de gestion des solvants et la possibilité d'élaborer un schéma de maîtrise des émissions en cas de dépassement des VLE.

1.5 Les moyens de remédiation

Afin d'éviter le rejet des COV les plus toxiques dans l'environnement et pour respecter les valeurs limites réglementaires, la première mesure à considérer est d'envisager leur substitution par des composés moins nocifs. Toutefois pour des raisons techniques (molécules non substituables) ou économiques (coût élevé de la modification du procédé industriel ou des installations), cette substitution n'est pas toujours réalisable. Plusieurs techniques de remédiation, schématisées sur la figure 8, peuvent donc être appliquées par les industries pour réduire ou éviter l'émission de COV dans l'atmosphère.

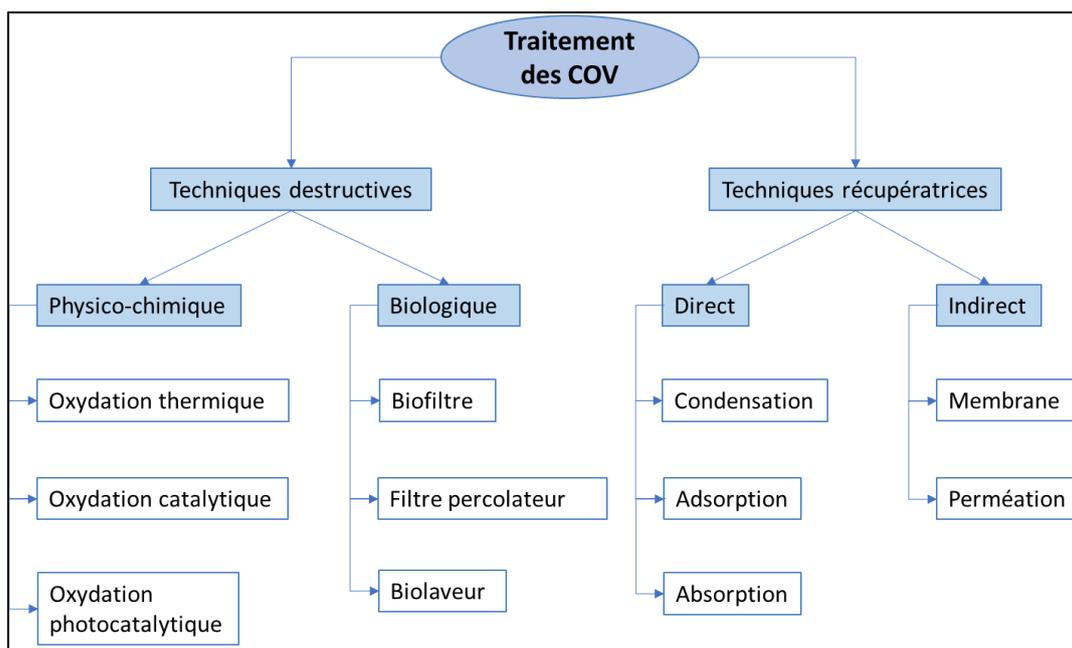


Figure 8 : Les différents procédés de remédiation des COV (Khan and Ghoshal, 2000; Le Cloirec, 2004)

Le traitement des molécules organiques peut s'effectuer grâce à des techniques destructives aboutissant à l'élimination des polluants ou à l'aide de techniques dites récupératrices permettant une revalorisation des composés (figure 8). Les méthodes destructives sont basées sur des phénomènes d'oxydation physico-chimique ou biologique, donnant lieu à la transformation des composés organiques volatils en dioxyde de carbone (CO₂) et eau (H₂O). Ce sont les méthodes les plus employées au niveau industriel (Khan and Ghoshal, 2000). Alors que certaines techniques sont toujours en cours de développement, trois solutions sont actuellement utilisées dans l'industrie :

- Deux procédés mobiles et un procédé statique composent l'**oxydation biologique** : le filtre percolateur, le biolaveur et le biofiltre. Ils permettent le traitement de l'effluent pollué par des bactéries ou des champignons microscopiques. Ces micro-organismes, en développement dans un liquide ou sur un solide, vont utiliser les xénobiotiques comme substrat puis les dégrader en eau, CO₂ et minéraux. Cette technique est utilisée dans seulement 5 % des cas de traitements de COV, principalement par les industries agro-alimentaires ou dans les stations d'épuration où elle permet notamment la dégradation des alcools, des acides et des cétones. Par ailleurs, le rendement d'oxydation des hydrocarbures aromatiques est compris entre 58 % et 95 % (Khan and Ghoshal, 2000). De plus, la dégradation métabolique est lente et les installations de traitement sont volumineuses.
- Egalement appelée « incinération », l'**oxydation thermique** est le traitement le plus souvent utilisé en industrie, avec environ 80 % des installations de remédiation (CITEPA, 2017). Cette oxydation par combustion permet la destruction de la plupart des COV utilisés en industries (peinture, vernis, industries agroalimentaires et pharmaceutiques), exceptés ceux contenant du chlore, du fluor ou du soufre. La combustion s'opère à une température comprise entre 850°C et 1 300°C et présente un rendement compris entre 95 et 99 % (Khan and Ghoshal, 2000). Toutefois, les hautes températures de combustion sont une limite à l'utilisation de cette méthode puisqu'elles engendrent un coût énergétique élevé et les fumées peuvent contenir des produits de réaction toxiques comme le monoxyde de carbone (CO) et les oxydes d'azote (NO_x), voire des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- L'**oxydation catalytique** est une alternative à l'oxydation thermique. En effet, la réaction des composés organiques s'effectue à des températures plus basses (comprises entre 200°C et 450°C) que dans le cas de la combustion, permettant ainsi de réduire les besoins énergétiques et d'éviter la formation de sous-produits potentiellement toxiques. Cette performance est possible grâce à l'ajout d'un catalyseur situé dans la chambre réactionnelle. Un catalyseur est une substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique et diminue l'énergie nécessaire pour qu'elle se déroule. Le catalyseur est généralement formé de deux phases. La première phase correspond au support, souvent composé d'alumine ou de silice, sur lequel est déposée une deuxième phase. Cette dernière renferme les espèces actives responsables du procédé de catalyse. Elle peut-être formée de métaux précieux (platine, palladium ou rhodium) ou d'oxydes métalliques (Co₂O₃, CuO, Fe₂O₃,...). Ce traitement destructif a plusieurs avantages, comme sa

facilité de mise en œuvre, la possibilité de récupérer l'énergie produite, sa capacité à traiter des mélanges complexes ainsi que des performances élevées. En effet, avec un rendement compris entre 90 % et 98 %, ce procédé permet d'oxyder certains COV industriels (Khan and Ghoshal, 2000). Toutefois des sous-produits, certains plus toxiques que les molécules initiales, peuvent être formés selon la température de réaction. Il y a donc des ajustements de température à effectuer pour obtenir une conversion totale du COV, tout en évitant la formation de produits secondaires.

Cependant, ces procédés ne sont pas adaptés pour tous les types de COV et à toutes les installations industrielles. Afin de sélectionner la technique de traitement la plus efficace, deux critères principaux sont à prendre en compte : le débit et la concentration en COV émis (Khan and Ghoshal, 2000). En effet, certaines techniques ne pourront pas être retenues dans le cas d'un débit trop élevé de l'effluent. C'est notamment le cas de l'oxydation catalytique qui exige un certain temps de contact entre le réactif et la surface du catalyseur. Pour cette raison, un temps de contact serait trop faible dans le cas d'un débit d'effluent trop élevé. La connaissance de la concentration du COV dans l'effluent est également essentielle. En effet, il sera plus facile d'envisager l'application d'une technique récupératrice dans le cas d'une concentration élevée de COV (exemple : la condensation) ou plutôt une technique comme l'oxydation catalytique, voire la photocatalyse pour un effluent dont la concentration de COV est faible. Le choix d'un procédé est orienté grâce à des analyses physico-chimiques préliminaires, comme le débit et la température du flux gazeux à traiter ou encore la nature et la concentration des COV. Sur le plan technico-économique, l'efficacité et la fiabilité du procédé dans le temps, de même que sa maintenance et son coût de fonctionnement sont également des paramètres déterminants dans le choix d'une technique de remédiation. Il peut être également souligné que l'efficacité d'un procédé est déterminée d'après sa capacité à transformer un COV primaire. Toutefois, il apparaît essentiel aussi qu'au cours de la conversion des polluants, la sélectivité de la réaction soit surveillée afin d'éviter la formation de produits secondaires, qui pourraient présenter eux aussi une toxicité significative.

2. Toxicologie humaine des COV

Le potentiel toxique d'une molécule dépend de différents paramètres, tels que la structure chimique et l'état physique du composé en contact avec l'organe cible, la dose absorbée ou encore la durée d'exposition (Casarett et al., 2001). Deux processus biologiques permettent de décrire la toxicité d'une molécule : la toxicocinétique qui étudie le cheminement de la molécule exogène dans l'organisme et la toxicodynamique qui évalue ses interactions avec ses cibles macromoléculaires entraînant la survenue d'effets néfastes. La deuxième partie bibliographique de ce chapitre sera ainsi consacrée à l'étude de la toxicocinétique et aux

différents mécanismes d'action des COV en général puis nous nous intéresserons à la toxicité des 4 hydrocarbures aromatiques d'intérêt, c'est-à-dire le benzène, le toluène, le m-xylène et le mésitylène.

2.1 Toxicocinétique des COV

2.1.1 Toxicocinétique générale des xénobiotiques

Le devenir d'un composé dans l'organisme humain, présenté dans la figure 9, est conditionné par 4 phénomènes biologiques synthétisés sous l'acronyme ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination.

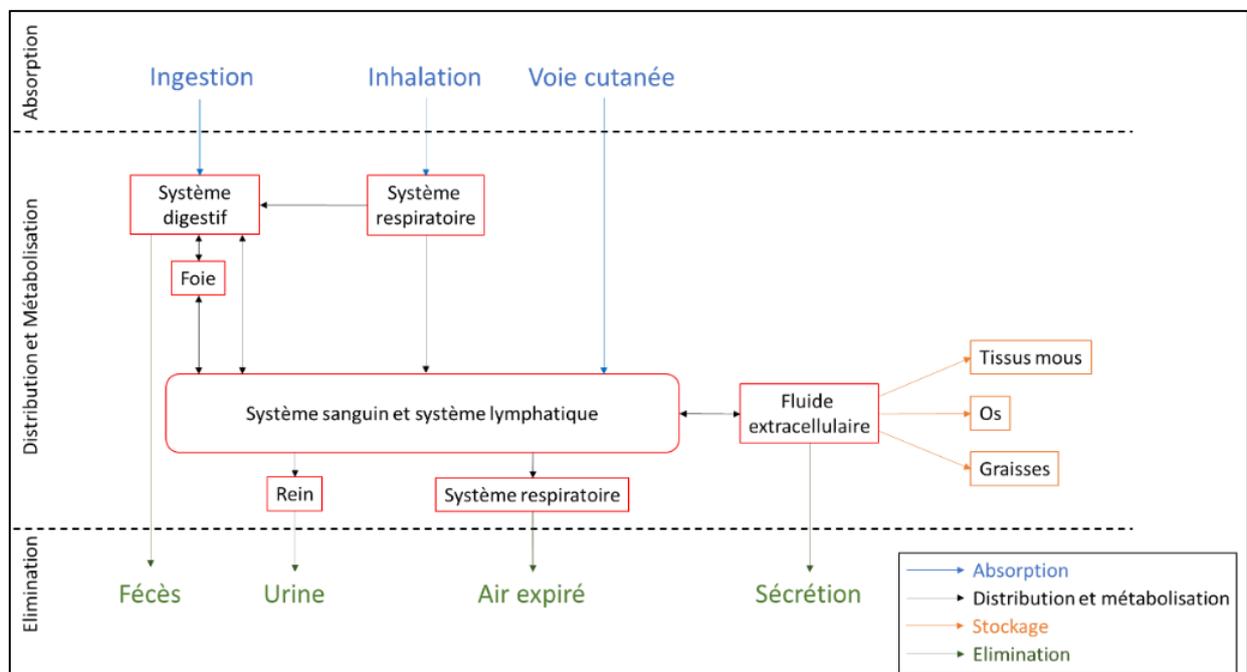


Figure 9 : Toxicocinétique des xénobiotiques (INRS, 2012a)

L'**absorption**, première étape de la toxicocinétique, correspond au processus de pénétration de molécules exogènes dans l'organisme. La dangerosité dépend du toxique et de la voie d'exposition. L'entrée du toxique s'effectue principalement par 3 voies principales : la voie pulmonaire, la voie digestive et la voie cutanée (INSERM, 2013).

Après avoir traversé les cellules épithéliales et atteint le système sanguin, les molécules sont transportées dans tout l'organisme et se répartissent dans plusieurs organes et tissus cibles. Il s'agit de la phase de **distribution tissulaire**. Les étapes d'adsorption et de distribution sont étroitement liées puisque les propriétés physico-chimiques des xénobiotiques (masse moléculaire, réactivité, volatilité, solubilité, ...) et la nature de la barrière à traverser influencent les mécanismes de diffusion des molécules. En effet les

membranes cellulaires, composées d'une bicouche phospholipidique et de protéines, ont une perméabilité sélective. Ainsi, les molécules de faible masse molaire ou liposolubles franchissent les membranes cellulaires de manière passive et sont accumulées dans la phase lipidique de la cellule. En revanche, les molécules hydrophiles seront retenues en amont des pores membranaires (Casarett et al., 2001). La distribution des xénobiotiques dépend également de la voie d'exposition. Les toxiques lipophiles absorbés par inhalation ou par voie cutanée seront initialement distribués dans l'organisme avant d'atteindre les organes hépatiques tandis que s'ils sont ingérés, ces toxiques atteindront en premier le foie.

Afin d'éliminer les xénobiotiques des cellules, l'organisme peut utiliser deux stratégies différentes : l'utilisation immédiate de transporteurs membranaires qui vont évacuer les toxiques hors de la cellule ou la mise en place d'une phase de **transformation métabolique**. Il s'agit d'un mécanisme de détoxification enzymatique, modifiant les molécules lipophiles en molécules plus hydrophiles grâce à l'action catalytique d'Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX). L'augmentation de la synthèse de ces EMX, initiée par la présence des xénobiotiques, est connue sous le nom d'induction enzymatique. Chez les vertébrés, les EMX sont présentes dans tout l'organisme mais avec une concentration plus importante dans le foie (Casarett et al., 2001). Deux phases de réaction de métabolisation sont décrites : la première phase a pour rôle de fonctionnaliser les xénobiotiques grâce à des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Les principales enzymes intervenant dans cette phase sont les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP450), les alcools déshydrogénases (ADH) ou les aldéhydes déshydrogénases (ALDH). Puis, les enzymes de la phase II, comme par exemple les glutathion S-transférase (GST) ou les NAD(P)H-quinone oxydoréductases, conjuguent les métabolites fonctionnalisés avec des substances hydrophiles pour faciliter leur élimination (Rose and Hodgson, 2004). Même si l'objectif de la métabolisation est d'augmenter l'hydrophilie des toxiques en vue de leur élimination, la phase I de biotransformation crée parfois des composés plus réactifs et plus toxiques que les molécules initiales (Jana and Paliwal, 2007).

La dernière étape est l'**excrétion**, correspondant à l'élimination hors de l'organisme de la molécule inchangée ou de ses métabolites par des protéines de transport ou d'efflux (P-glycoprotéine ou Multidrug Resistance-Associated Proteins-MRP).. C'est une étape importante pour l'évaluation de la toxicité des substances puisque plus ces dernières seront excrétées rapidement, moins leur impact sur les cellules sera élevé. La principale voie d'excrétion est la voie rénale. Les voies gastro-intestinales, pulmonaires et cutanées sont également utilisées par l'organisme.

2.1.2 Etape 1 : exposition et absorption des COV

L'exposition individuelle à un ou plusieurs xénobiotiques dépend essentiellement de l'individu lui-même (âge, sexe, morphologie), de ses habitudes (tabagisme, activités, déplacement) ainsi que du temps passé dans les différents micro-environnements extérieurs et intérieurs, tels que le domicile ou le lieu de travail (Gokhale et al., 2008; Harrison, 2002; Sexton et al., 2004).

Parmi les microenvironnements intérieurs, le lieu de travail est l'une des principales sources d'exposition aux COV. L'exposition professionnelle impacte toutes les catégories de travailleurs (employés de bureau, ouvriers travaillant à l'extérieur ou à l'intérieur) et des domaines d'activité variés, tels que la fabrication de peinture (Seeber et al., 1996) et son application (Caro and Gallego, 2009; Vitali et al., 2006), la cordonnerie (Estevan et al., 2012), la distribution de carburants en station-service (Chen et al., 2002) ou encore l'imprimerie. La première voie d'exposition professionnelle est l'**inhalation** (Tormoehlen et al., 2014). L'air alvéolaire exhalé est donc souvent utilisé comme biomarqueur d'exposition. Ainsi, Caro et Gallego ont évalué l'absorption de COV chez 4 catégories de travailleurs (peintres en bâtiments, peintres automobiles, vernisseurs et employés de station-service) en comparant les molécules présentes dans l'air du poste de travail avec celles analysées dans l'air exhalé (Caro and Gallego, 2009). Les chercheurs ont démontré que les composés mesurés dans l'air ambiant à des concentrations élevées étaient également présents dans l'air alvéolaire des travailleurs, corrélant ainsi l'exposition personnelle à l'exposition professionnelle. Parmi les secteurs les plus émetteurs en solvants organiques, le métier de peintre automobile a fait l'objet de nombreuses études (Castaño et al., 2019; Wang et al., 2017). En effet, cette catégorie de travailleurs est exposée à des concentrations élevées de mélanges complexes de COV, provoquant à long terme des effets néfastes sur la santé. Cependant, l'absorption des molécules organiques par inhalation a diminué depuis ces 20 dernières années grâce à l'évolution de la réglementation, à la substitution ou à la réduction de l'utilisation de solvants et à l'installation d'équipements de protection collective (EPC) et au port d'équipements de protection individuelle (EPI) (Caro and Gallego, 2009). Ainsi avec l'utilisation correcte d'EPC et d'EPI, l'inhalation n'est plus la voie d'exposition principale et est remplacée par l'**absorption cutanée**. En effet, les travaux de Chang et al., (2007) ont mis en évidence que la voie cutanée devenait le principal contributeur de l'exposition au xylène lorsque des peintres portaient des appareils de protection respiratoire, avec un pourcentage d'absorption totale pouvant atteindre 64 % au niveau cutané (Chang et al., 2007). L'absorption cutanée des solvants peut se faire soit par dépôt direct des aérosols de peinture sur la peau des travailleurs ou par transfert secondaire à partir des vêtements. Pour finir, l'**ingestion** est une voie d'exposition professionnelle secondaire. L'absorption peut avoir lieu lors de la déglutition des substances chimiques initialement inhalées, ou par transfert du polluant présent sur les mains non lavées vers la bouche.

Parmi les 80 % de temps que nous passons dans un environnement intérieur, 60 % sont alloués au domicile (Thatcher, 1995). Le micro-environnement domestique est donc un facteur déterminant lors de l'évaluation des expositions individuelles (Delgado-Saborit et al., 2011). Dans le micro-environnement que représente le domicile, l'inhalation est également la voie d'exposition principale des COV. Les sources de pollution sont diverses et les COV peuvent être émis en continu (matériaux de construction, peinture, ameublement) ou ponctuellement (tabac, parfum, cuisine, pollution extérieure) (Kim et al., 2001; Zhang and Smith, 2003). Les voies digestives et cutanées sont quant à elles des voies d'exposition minoritaires et concernent surtout l'absorption accidentelle de composés organiques domestiques présents dans les produits ménagers ou de construction (Tormoehlen et al., 2014).

2.1.3 Etape 2 : distribution

La répartition des COV dans les différentes matrices biologiques (sang, tissus ou organes) dépend de leur caractère lipophile ou hydrophile (Meulenberg and Vijverberg, 2000). Ainsi la majorité des COV sont des substances lipophiles (hydrocarbures aliphatiques, alicycliques et aromatiques) se répartissant plus facilement dans les tissus riches en graisses comme les tissus adipeux ou la moelle osseuse. Ils peuvent donc être stockés dans le cerveau, le foie, les muscles ou le rein. En revanche, les composés comme les cétones, les alcools et les esters sont des espèces hydrophiles (Poulin and Krishnan, 1996). Après absorption, ces dernières sont retrouvées principalement dans le sang.

2.1.4 Etape 3 : métabolisation

De par leur hétérogénéité de composition en groupements fonctionnels, tous les COV ne sont pas métabolisés par les mêmes EMX (Castell et al., 2005; Jana and Paliwal, 2007). De plus, les EMX impliquées dépendent également du tissu cible puisque ces dernières ne sont pas exprimées de la même manière dans les différents organes (Castell et al., 2005). Par conséquent, l'induction de ces enzymes peut être considérée comme biomarqueur pertinent de l'exposition aux différentes molécules organiques. C'est le cas du *CYP1A1* connu pour son rôle dans le métabolisme des HAP (Guéguen et al., 2006; Savary et al., 2018) ou encore des enzymes de la phase II *NAT1* (N-acétyltransférase 1) et *NAT2* (N-acétyltransférase 2) dont le gène est induit en présence d'amines aromatiques hétérocycliques (Koda et al., 2017). Concernant le *CYP2E1*, il est impliqué dans la biotransformation de nombreux composés organiques tels que les hydrocarbures substitués (alcool), les hydrocarbures benzéniques (benzène, toluène) ou les hydrocarbures aliphatiques (1,3-butadiène) (INSERM, 2001). Parmi les EMX de la phase I, on retrouve également *EPHX1* (Epoxide Hydrolase 1) induit par les composés possédant un noyau benzénique (Castell et al., 2005; Lee et al., 2006; Sheets et al., 2004) ou *ADH* (Alcool Déshydrogénase) et *ALDH* (Aldéhyde Déshydrogénase) dont l'expression dépend des alcools et des aldéhydes, respectivement (Edenberg and Bosron, 2010; Marchitti et al., 2010). La glutathion S-

transférases (*GSTM1* et *GSTT1*) et *NQO1* (NAD(P)H Quinone Déshydrogénase 1) appartiennent à la famille d'enzymes de la phase II. Elles interviennent dans le métabolisme de la majorité des aldéhydes, des hydrocarbures aromatiques et des hydrocarbures aliphatiques (INSERM, 2001).

Ainsi, la biotransformation est un élément clé dans la toxicité des COV puisqu'elle joue un rôle de protection des cellules (Casarett et al., 2001). Toutefois, certains produits issus de la métabolisation des COV peuvent induire des effets plus délétères sur l'organisme que les molécules initiales (Jana and Paliwal, 2007). C'est le cas de l'époxybenzène (métabolite du benzène) connu pour sa toxicité hématopoïétique (Ciranni et al., 1991).

2.1.5 Etape 4 : excrétion

L'élimination des COV inhalés est un processus rapide. En 1997, une étude a porté sur la mesure des concentrations sanguines de 21 composés organiques volatils avant, pendant et après exposition de cinq individus (Ashley and Prah, 1997). Cette étude a mis en évidence que pour toutes les substances étudiées, leur temps de demi-vie dans l'organisme était inférieur à 30 minutes. Toutefois, l'excrétion totale de ces molécules a lieu sur le long terme puisque les résultats obtenus ont également confirmé l'existence d'un mécanisme de stockage (deuxième étape du processus de toxicocinétique). Enfin, lors d'expositions répétées aux xénobiotiques, une bioaccumulation peut avoir lieu dans les organes. Cette dernière est dépendante de la fréquence et de la durée d'exposition (Ashley and Prah, 1997).

Tout comme l'absorption, l'élimination des COV peut se faire par différentes voies. Ces derniers peuvent tout d'abord être excrétés sans subir de modification métabolique préalable, dans l'air expiré ou dans l'urine (Janasik et al., 2008). Toutefois, ces 2 voies d'excrétion du COV non modifié ne représentent qu'un faible pourcentage de l'excrétion totale. En effet, l'élimination des substances organiques se fait principalement à travers l'excrétion de métabolites urinaires obtenus lors de l'étape de métabolisation. Ces métabolites, peu volatils en comparaison à leurs composés parents, sont régulièrement utilisés comme biomarqueurs d'exposition car ils ont l'avantage d'avoir à la fois une demi-vie plus longue que les composés présents dans le sang ou l'air exhalé mais sont suffisamment non-persistants pour corrélérer leur présence avec des expositions spécifiques (Alwis et al., 2012; Ding et al., 2009). De plus, la méthode de prélèvement d'échantillons urinaires est non-invasive (Al Zabadi et al., 2011). En revanche, certaines de ces molécules manquent de spécificité. C'est le cas de l'acide benzylmercapturique (BMA), utilisé comme biomarqueur d'exposition au toluène mais pouvant être formé par métabolisation de l'alcool benzylique, molécule présente dans les produits cosmétiques. Le tableau 5 recense quelques métabolites urinaires et leurs COV correspondants.

Tableau 5 : principaux métabolites urinaires des COV (Alwis et al., 2012; Ding et al., 2009)

	Métabolites	COV
CEMA	N-Acétyle-S-(2-carboxyéthyl)-L-cystéine	acroléine
2HPMA	N-Acétyle-S-(2-hydroxypropyl)-L-cystéine	oxyde de propylène
3HPMA	N-Acétyle-S-(3-hydroxypropyl)-L-cystéine	acroléine
MHBMA1	N-Acétyle-S-(1-hydroxyméthyl-2-propényl)-L-cystéine	
MHBMA2	N-Acétyle-S-(2-hydroxy-3-butényl)-L-cystéine	1,3 butadiène
MHBMA3	N-Acétyle-S-(4-hydroxy-2-butén-1-yl)-L-cystéine	
DHBMA	N-Acétyle-S-(3,4-dihydroxybutyl)-L-cystéine	1,3 butadiène
HEMA	N-Acétyle-S-(2-hydroxyéthyl)-L-cystéine	acrylonitrile oxyde d'éthylène
AAMA	N-Acétyle-S-(2-hydroxypropyl)-L-cystéine	acrylamide
GAMA	N-Acétyle-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyéthyl)-L-cystéine	acrylamide
CYMA	N-Acétyle-S-(2-cyanoéthyl)-L-cystéine	acrylonitrile
PMA	N-Acétyle-S-(phényl)-L-cystéine	benzène
BPMA	N-Acétyle-S-(n-propyl)-L-cystéine	1-bromopropane
TTCA	acide 2-thioxothiazolidine-4-carboxylique	disulfure de carbone
HPMMA	N-Acétyle-S-(3-hydroxypropyl-1-méthyl)-L-cystéine	crotonaldéhyde
AMCC	N-Acétyle-S-(N-méthylcarbamoyl)-L-cystéine	N,N-Diméthylformamide
PGA	acide phénylglyoxylique	éthylbenzène styrène
PHEMA	N-Acétyle-S-(1-phényl-2-hydroxyéthyl)-L-cystéine	styrène
MA	acide mandélique	styrène
TCVMA	N-Acétyle-S-(trichlorovinyl)-L-cystéine	tétrachloroéthylène
BMA	N-Acétyle-S-(benzyl)-L-cystéine	toluène
HA	acide hippurique	toluène
o-crésol	ortho-crésol	toluène
1,2DCVMA	N-Acétyle-S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cystéine	
2,2DCVMA	N-Acétyle-S-(2,2-dichlorovinyl)-L-cystéine	trichloroéthylène
t,t MA	acide trans,trans-muconique	benzène
DPMA	N-Acétyle-S-(2,4-diméthylphényl)-L-cystéine N-Acétyle-S-(2,5-diméthylphényl)-L-cystéine N-Acétyle-S-(3,4-diméthylphényl)-L-cystéine	xylène

2MHA	acide 2-Méthylhippurique	
3MHA	acide 3-Méthylhippurique	xylène
4MHA	acide 4-Méthylhippurique	

2.2 Effet des COV sur la santé

Le premier article relatant les effets cliniques d'une exposition aux COV date de 1926 (Tormoehlen et al., 2014). Depuis, de nombreuses études toxicologiques ont été réalisées afin de déterminer les impacts sur la santé humaine de ces molécules. Ces derniers sont dépendants de la structure de la molécule, ainsi que de sa réactivité (Rumchev, 2004). C'est pourquoi les effets toxiques sont nombreux et affectent la plupart des fonctions de l'organisme, que ce soit lors d'expositions aiguë ou chronique. Cette partie a donc pour objectif de recenser les différents effets toxiques des COV, tels que les effets neurosensoriels et neurologiques, les réactions inflammatoires ou encore les effets cancérogènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR). Les COV peuvent également impacter les fonctions cardiaques, rénales et gastro-intestinales (Tormoehlen et al., 2014) mais ces effets ne seront pas évoqués dans ce chapitre.

2.2.1 Effets neurosensoriels et neurologiques

Le système nerveux central (SNC) constitue l'une des principales cibles des COV après leur inhalation. Le SNC comprend le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet et a pour rôle de contrôler les activités essentielles à l'organisme comme l'équilibre, le comportement, les émotions ou encore les fonctions intellectuelles. Une courte exposition aux COV provoque une dépression du SNC, avec l'apparition de plusieurs symptômes réversibles après l'arrêt de l'exposition : maux de tête, nausées et vomissements, étourdissements et vertiges (Dick, 2006). Pour des concentrations élevées, ces troubles peuvent progresser vers une perte de connaissance, des convulsions voire entraîner le décès de l'individu exposé. Même si ces effets neurologiques sont communs à la plupart des COV, leur apparition dépend de la dose absorbée et de la nature du COV. En effet, des sensations de vertige ont été observées pour une exposition au benzène à une concentration comprise entre 250 et 500 ppm alors que ce symptôme a été induit par des concentrations plus faibles en toluène, de l'ordre de 80 à 150 ppm (Echeverria et al., 1991). L'impact neurologique d'une exposition chronique aux hydrocarbures aromatiques, souvent utilisés comme solvants, a beaucoup été étudié dans les milieux professionnels. Les principales catégories de travailleurs exposés sont ceux appartenant au domaine de la peinture industrielle, du nettoyage à sec et de l'imprimerie (Dick, 2006). Ces études ont évalué les effets de l'exposition individuelle des travailleurs avec la réalisation de tests portant sur l'orientation, la mémoire, le langage et la fonction psychomotrice. Ainsi, les résultats ont montré un lien entre une exposition professionnelle aux solvants et une augmentation d'effets neurologiques qui diffèrent selon les molécules. Par exemple, l'inhalation du toluène ou du styrène provoque des troubles de la vision des couleurs, mêmes

pour de faibles concentrations (Cavalleri et al., 2000; Lomax et al., 2004). En revanche, dans une étude menée chez des techniciens en histologie, l'exposition aux vapeurs de formaldéhyde a été associée à une altération de la mémoire et de la coordination (Kilburn et al., 1985).

2.2.2 Pathologies inflammatoires et allergiques

Les composés organiques peuvent endommager les fonctions du système respiratoire et induire des pathologies telles que l'asthme, ou encore des allergies comme par exemple les rhinites allergiques et des irritations des muqueuses. Ces effets varient selon la durée d'exposition et sont plus importants chez les personnes sensibles comme par exemple les personnes asthmatiques et les enfants (Cakmak et al., 2014).

Premièrement, plusieurs études ont montré une corrélation entre une exposition aux COV et l'apparition de syndromes asthmatiques (Nurmatov et al., 2015). En 2011, Billionnet et al. ont analysé les effets de plusieurs COV mesurés dans 567 logements français et la prévalence pour la population d'étude de développer un asthme (Billionnet et al., 2011). Les auteurs ont démontré que la présence de n-undecane (hydrocarbure aliphatique) et de 1,2,4-triméthylbenzène (hydrocarbure aromatique) était associée significativement au développement de l'asthme. L'étude de Rumchev confirme également l'implication des hydrocarbures aromatiques dans l'apparition d'asthme chez les enfants (Rumchev, 2004). En effet, les chercheurs ont observé une amplification des symptômes asthmatiques lorsque les concentrations ambiantes en benzène et toluène augmentaient de $10 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. De nombreuses études dans les micro-environnements professionnels ont également montré une augmentation de la prévalence de maladies respiratoires non cancéreuses telles que l'asthme ou les infections broncho-pulmonaires, lors d'expositions chroniques au styrène pour des concentrations comprises entre 42 et 72 ppm (Nett et al., 2017). Dans 3 % des cas, ces maladies chroniques ont entraîné le décès des travailleurs exposés. Une étude en milieu urbain et rural, a montré une association entre l'exposition d'enfants à l'acétaldéhyde, au xylène et au toluène, composés présents dans l'air intérieur, avec une prévalence plus importante de l'asthme (Hulin et al., 2010). Les syndromes asthmatiques peuvent être reliés à la mesure de marqueurs biologiques de l'inflammation, tels que uLTE4 (urine leukotriene E4) ou FeNO (Fractional exhaled nitric oxide) (Kwon et al., 2018). En effet, les auteurs ont mesuré une augmentation de l'expression de uLTE4 et une diminution de FeNO chez 34 sujets ayant été déplacés au cours de leur hospitalisation d'un bâtiment ancien à un bâtiment rénové. Dans les locaux récents, les chercheurs ont également mesuré des concentrations plus élevées en benzène, toluène, éthylbenzène, styrène, xylène, formaldéhyde et acétaldéhyde. Ces résultats ont été corrélés avec une aggravation des symptômes respiratoires chez les patients asthmatiques.

Une exposition prolongée aux COV peut également induire le développement de réactions allergiques, telles que les rhinites, les infections des voies respiratoires, les conjonctivites ou les dermatites atopiques (Roda et al., 2011). Dans l'étude de Billionnet et al., une corrélation significative a été observée entre l'inhalation d'hydrocarbures halogénés et l'apparition de rhinites allergiques (Billionnet et al., 2011). Le formaldéhyde est quant à lui mis en cause dans l'induction de symptômes atopiques, même pour des concentrations d'exposition inférieures aux valeurs guides (Garrett et al., 1999; McGwin et al., 2010). Des recherches ont montré que l'exposition aux COV durant le stade fœtal pouvait altérer le système immunitaire de l'enfant, augmentant la susceptibilité de développer des allergies (Baiz et al., 2011; Lehmann et al., 2008).

Enfin, la plupart des COV provoque des irritations au niveau oculaire, cutané ou respiratoire. Parmi ces composés organiques, le formaldéhyde est l'un des plus irritants y compris à de très faibles concentrations (Wolkoff et al., 2006). Les vapeurs de xylène peuvent également irriter l'appareil respiratoire supérieur et les yeux tandis qu'un contact prolongé sous sa forme liquide entraîne des irritations de la peau et une possible desquamation (Cometto-Muñiz and Cain, 1995).

2.2.3 Effets Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques

L'absorption par l'organisme de certains xénobiotiques peut être à l'origine d'effets cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR). L'article R4411-6 du code du travail donne la définition de ces 3 effets⁶ :

- Cancérogène : « *substance et mélange qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent provoquer un cancer ou en augmenter la fréquence* »
- Mutagène : « *substance et mélange qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire des défauts génétiques héréditaires ou en augmenter la fréquence* »
- Toxique pour la reproduction ou reprotoxique : « *substance et mélange qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire ou augmenter la fréquence d'effets nocifs non héréditaires dans la progéniture ou porter atteinte aux fonctions ou capacités reproductives* ».

Les données obtenues dans les enquêtes épidémiologiques et les études *in vivo*, permettent de classer les molécules en fonction de leurs propriétés CMR. En France, deux classifications coexistent. La première classification, divisée en 3 catégories, est établie par l'Union Européenne et figure en annexe VI du règlement CE n°1272/2008 (tableau 6).

⁶ Article R4411-6 du code du travail

Tableau 6 : Classification des substances cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR) de l'Union Européenne

	Catégories	Définitions
C	1A	Substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est avéré
	1B	Substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé
	2	Substances suspectées d'être cancérigènes pour l'homme
M	1A	Substances dont la capacité d'induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains est avérée
	1B	Substances dont la capacité d'induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains est supposée
	2	Substances suspectées d'induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains.
R	1A	Substances dont la toxicité pour la reproduction humaine est avérée
	1B	Substances dont la toxicité pour la reproduction humaine est supposée
	2	Substances suspectées d'être toxiques pour la reproduction humaine

La deuxième classification concerne uniquement l'effet cancérigène classé en 5 groupes par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) :

- Groupe 1 : agent cancérigène pour l'Homme
- Groupe 2A : agent probablement cancérigène pour l'Homme
- Groupe 2 B : agent peut-être cancérigène pour l'Homme
- Groupe 3 : agent inclassable quant à sa cancérigénicité pour l'Homme
- Groupe 4 : agent probablement pas cancérigène pour l'Homme

Plusieurs COV ont des propriétés Cancérigènes, Mutagènes ou Reprotoxiques. Par exemple, le dichlorométhane, appartenant à la famille des hydrocarbures aliphatiques halogénés, est classé dans le groupe 2B « peut-être cancérigène » par le CIRC et catégorie 2 « substance suspectée d'être cancérigène » par l'UE. Les principaux cancers induits par l'exposition à un ou plusieurs hydrocarbures volatils sont ceux touchant le système respiratoire, le cerveau, le système nerveux, le système endocrinien ou la peau (Boeglin et al., 2006). En revanche, le benzène est connu pour ses effets cancérigènes sur le système hématopoïétique. Du fait de son pouvoir leucémogène, il est classé groupe 1 par le CIRC et catégorie 1 par l'UE. Le benzène a également des propriétés mutagènes (catégorie 2 par l'UE). En effet, il induit des aberrations chromosomiques chez les individus exposés (Gaskell et al., 2004). Enfin, le toluène est un exemple de COV pouvant avoir des effets sur la reproduction. Des études toxicologiques ont montré son impact possible sur la fertilité des femmes et le développement embryonnaire (Plenge-Bönig and Karmaus, 1999). Toutefois par manque d'informations complémentaires, cette molécule est actuellement classée par l'UE dans la catégorie 2 des substances suspectées d'être toxiques pour la reproduction humaine.

2.3 Toxicologie humaine des 4 COV d'étude

2.3.1 Le benzène

Toxicocinétique du benzène :

Environ 50 % de la dose de benzène inhalé est absorbé par voie pulmonaire, ce qui en fait la principale voie d'absorption chez l'Homme. Il peut également être absorbé par voie percutanée lors de la manipulation de solvants liquides ou par absorption cutanée des vapeurs, avec des estimations d'absorption de 0,2 et 0,05 % respectivement. Une fois dans la circulation systémique, le benzène peut ensuite être distribué dans le sang et dans les tissus riches en lipides de différents organes comme le cerveau, le foie, le rein ou l'estomac. La métabolisation du benzène (figure 10) se déroule principalement dans le foie et entraîne la formation de métabolites toxiques pour l'organisme, tel que les phénols, l'acide trans,trans-muconique, l'hydroquinone ou les benzoquinones. Ces dernières sont surtout myélotoxiques, provoquant une diminution ou une interruption de la production de certaines cellules sanguines (INRS, 2011d; Snyder and Hedli, 1996). Entre 24 et 36 heures après exposition, environ un tiers du benzène absorbé est éliminé dans les urines sous ses formes métabolisées. Un faible pourcentage (1 %) peut toutefois être évacué par voie urinaire sous forme inchangée. Enfin, le benzène est également excrété dans l'air exhalé avec un pourcentage variant de 10 à 50 %. En effet, l'excrétion est dépendante de l'activité physique de l'individu et du tissu où la molécule a été stockée. Elle s'effectue en plusieurs étapes plus ou moins rapides (de quelques minutes jusqu'à 24 h après exposition).

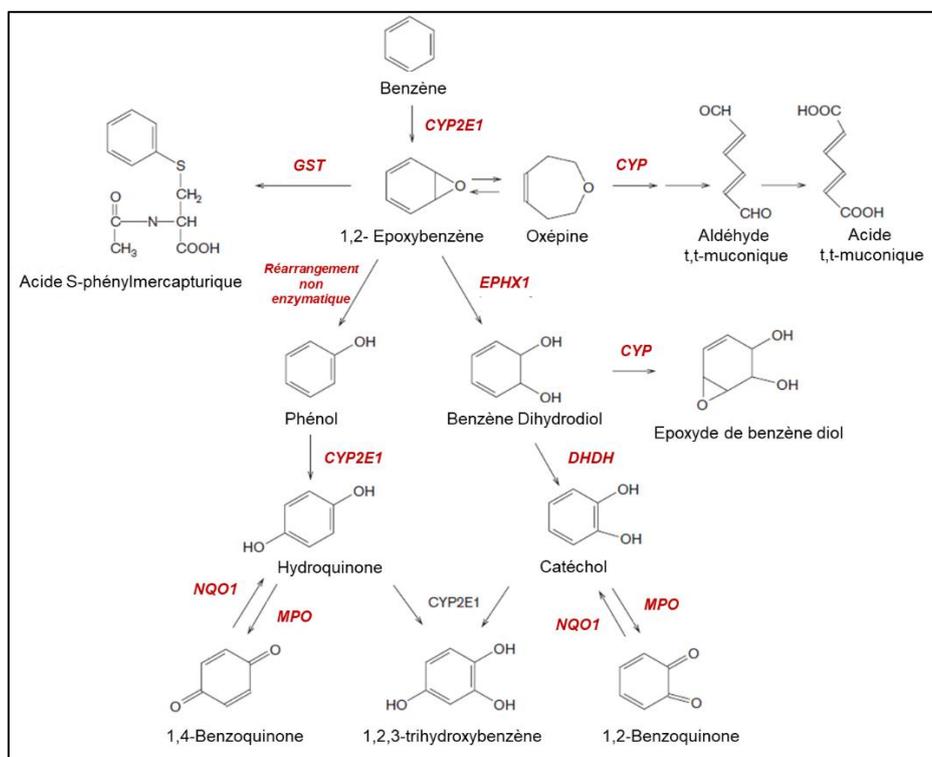


Figure 10 : Métabolisme du benzène (inspiré de INRS, 2011d; Snyder and Hedli, 1996)

Effets neurotoxiques :

Comme tous les solvants organiques, l'inhalation du benzène provoque des effets toxiques sur le SNC. Les symptômes neurologiques observés dépendent de la dose inhalée et de la durée d'exposition. Ainsi, une exposition aiguë à ce composé organique entraîne une dépression du SNC avec l'apparition de maux de tête, de nausées, de somnolence ou de vertiges (INRS, 2011d). Pour les plus fortes concentrations, c'est-à-dire supérieures à 500 ppm, des symptômes plus importants peuvent apparaître comme des convulsions ou une perte de conscience. Lors d'expositions répétées, les symptômes observés sont une diminution des capacités d'attention et de mémorisation, des troubles du sommeil ou encore un état dépressif.

Pathologies inflammatoires et allergiques :

Un contact cutané avec le benzène peut entraîner des irritations locales réversibles (INRS, 2011d). Quelques enquêtes épidémiologiques ont également montré le lien entre une exposition par voie pulmonaire au benzène et l'augmentation de certaines pathologies inflammatoires telles que l'asthme. En 2004, Rumchev et al. ont ainsi démontré qu'une exposition à une concentration de benzène de $10 \mu\text{g.m}^{-3}$, ce qui correspond à 3 ppb, multipliait par trois le risque de développer de l'asthme chez l'enfant (Rumchev, 2004). Pour des concentrations ambiantes supérieures à $20 \mu\text{g.m}^{-3}$ (6 ppb), le risque était multiplié par 8 par rapport à la population témoin. Chez des cohortes d'enfants, la concentration en benzène dans l'air exhalé a également été associée à l'augmentation de symptômes asthmatiques sévères (Delfino et al., 2003). Enfin, une étude prospective ayant pour objectif d'évaluer l'effet toxique de polluants de l'air intérieur sur la santé de nouveau-nés, a montré une augmentation du nombre d'infections respiratoires chez les nourrissons exposés à plus de $5 \mu\text{g.m}^{-3}$ de benzène (1,5 ppb). Le risque pour les nourrissons de développer des infections des voies pulmonaires a également été relié au tabagisme passif et à des restaurations récentes au sein de logements (peinture et revêtement de sol) (Diez et al., 2000).

Effets Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques :

Le benzène est connu pour ses effets toxiques sur le système hématopoïétique à l'origine de troubles hématologiques non malins (thrombopénie, leucopénie ou anémie) et sur son rôle dans la survenue de leucémies ou de lymphomes non hodgkinien (Lan et al., 2004). De par ce pouvoir leucémogène, le benzène a été classé dans le groupe 1 « agent cancérogène pour l'Homme » par le CIRC et dans la catégorie 1 « substances dont le potentiel cancérogène pour l'homme est avéré » par l'UE. Ce composé organique est également classé dans la catégorie 2 des substances mutagènes par l'UE. En effet, des aberrations chromosomiques au niveau des cellules somatiques et germinales ont été observées lors d'expositions professionnelles (Lau et al., 2009).

2.3.2 Le toluène

Toxicocinétique du toluène :

Après inhalation, voie d'exposition principale, 50 % du toluène est absorbé par l'organisme dans les 15 minutes suivant le début de l'exposition. Le toluène se retrouve donc rapidement dans le système sanguin. L'ingestion du toluène entraîne 100 % d'absorption du composé mais avec une vitesse plus lente que l'absorption par voie pulmonaire puisque le pic sanguin n'est observé que 2 h après exposition. Enfin, la voie cutanée est négligeable puisque la vitesse d'absorption du toluène est lente : inférieure à $20 \text{ mg.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Comme la plupart des COV, le toluène est surtout distribué dans les tissus riches en lipides (cerveau, foie, rein ou estomac), et notamment aussi dans la matière blanche du système nerveux central. Il peut également traverser la barrière placentaire et être stocké dans le lait maternel. La demi-vie du toluène dans les tissus adipeux est de 77 h, augmentant le risque d'accumulation, surtout pour les travailleurs. Environ 80 % de la dose absorbée en toluène est métabolisé par le foie. La première étape de métabolisation permet d'oxyder le toluène en alcool benzylique grâce aux cytochromes P450, tels que *CYP2E1*, *CYP2B6*, *CYP1A1* et *CYP1A2*. Le principal métabolite urinaire est l'acide hippurique, formé par la conjugaison de la glycine avec l'acide benzoïque. Il s'agit de la voie principale de métabolisation du toluène (figure 11). Pour les 3 voies d'exposition, 80 % du toluène absorbé est éliminé dans l'urine après transformation métabolique tandis que les 20 % restants sont évacués par voie pulmonaire. Seulement 0,06 % de la dose initiale est excrétée par voie urinaire sous forme inchangée (EPA, 2005; INRS, 2012b).

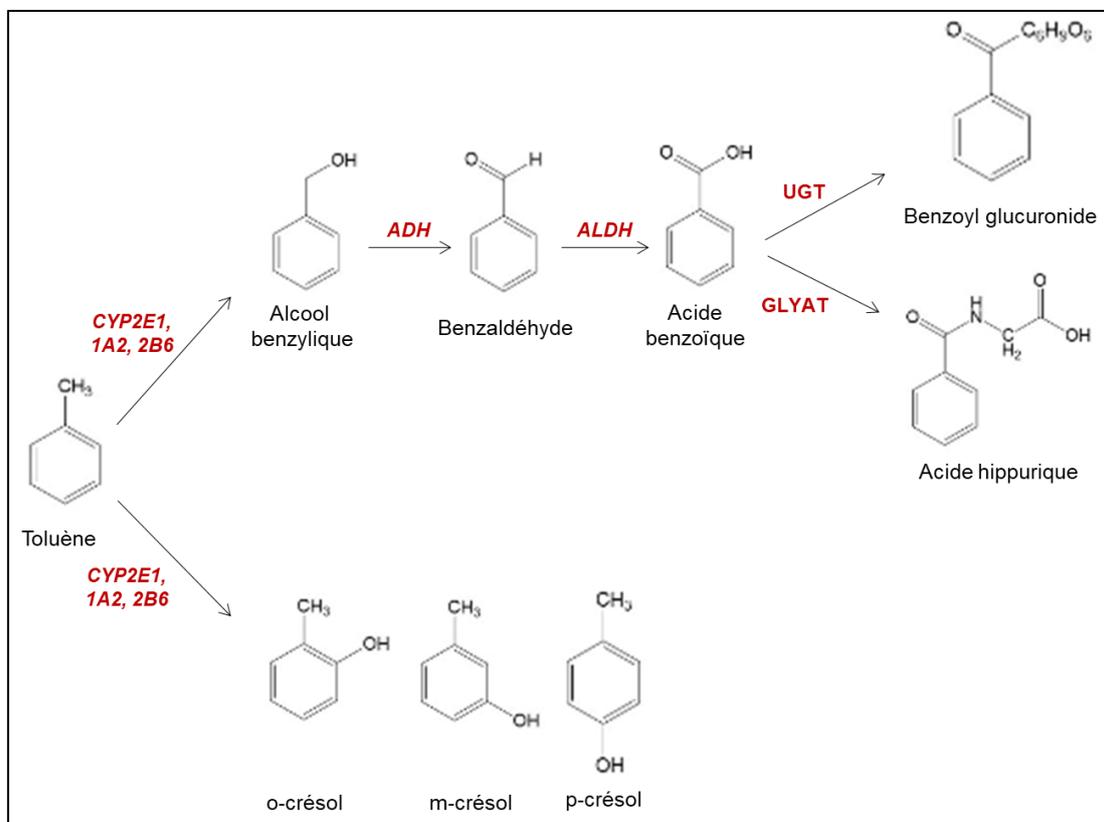


Figure 11 : Métabolisme du toluène (inspiré de INRS, 2012b; Woiwode et al., 1979)

Effets neurotoxiques :

Après absorption par l'organisme, le toluène traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et occasionne des effets néfastes sur le SNC (Win-Shwe and Fujimaki, 2010). Contrairement aux autres hydrocarbures aromatiques, la neurotoxicité du toluène est causée par la molécule elle-même et non par la formation de métabolites secondaires (INRS, 2012b). Les principaux symptômes observés chez des individus exposés au toluène sont des insomnies, des troubles de la mémoire et de la concentration ou encore une diminution des performances intellectuelles (Echeverria et al., 1991). Des tests psychométriques mettent en évidence une diminution de la dextérité manuelle, de la discrimination des couleurs et de la perception visuelle (Kobald et al., 2015). Utilisé comme solvant pour la peinture, le toluène est très présent dans les environnements professionnels. Plusieurs enquêtes ont évalué les effets de la molécule sur les populations de peintres. Wang et Chen ont ainsi remarqué une augmentation du nombre de maux de tête, de vertiges et de dépressions chez les travailleurs d'un groupe fortement exposé au toluène par rapport à ceux faiblement exposés (Wang and Chen, 1993). Des études ont également fait le lien entre l'exposition au toluène et l'apparition de toxicité neurosensorielle, telle qu'une augmentation de pertes d'audition (Chang et al., 2006; Waniusiow et al., 2009).

Pathologies inflammatoires et allergiques :

Le contact cutané avec la molécule de toluène provoque également des dermatoses d'irritation (INRS, 2012b). Le toluène participe au développement de symptômes asthmatiques. Une étude française a comparé les effets de la pollution de l'air intérieur chez des enfants vivants en milieu urbain ou rural (Hulin et al., 2010). Les auteurs ont remarqué que les environnements urbains étaient plus pollués que les environnements ruraux. Dans un deuxième temps, ils ont constaté que l'exposition au toluène était associée significativement à l'induction d'asthme chez les enfants vivant dans les villes. Dans leur enquête épidémiologique, Rumchev et al. ont également évalué l'impact des COV, dont le toluène, sur l'apparition de symptômes inflammatoires, avec un odds-ratio de 1,03 (IC₉₅ : 1,02-1,07) pour l'asthme en ajustant sur les co-expositions aux autres COV (Rumchev, 2004). Des études ont également révélé son implication dans l'apparition d'eczéma chez les enfants (Bolden et al., 2015).

Effets Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques :

Les données sur l'induction de cancer par le toluène sont insuffisantes pour pouvoir affirmer son pouvoir cancérogène. Le toluène n'est pas classé par l'UE. Le CIRC a classé la molécule dans le groupe 3 (agent inclassable) sur la base de preuves insuffisantes chez l'Homme et l'absence de cancérogénicité chez l'animal. Les différentes études toxicologiques n'ont également pas montré d'effets mutagènes significatifs chez des travailleurs exposés. Toutefois, le toluène est classé toxique pour la reproduction de catégorie 2 par l'UE suite à des études montrant chez l'animal des effets sur le développement fœtal, notamment un retard de

croissance et du développement squelettique. Cette reprotoxicité pourrait s'expliquer par une toxicité maternelle et non par un effet développemental direct de la substance (ANSES, 2017a). Chez l'Homme, l'inhalation intentionnelle de grandes quantités de toluène aurait une action néfaste sur la fertilité des femmes toxicomanes et le développement embryonnaire (Plenge-Bönig and Karmaus, 1999) et sur les mécanismes de régulation du système endocrinien (Svensson et al., 1992).

2.3.3 Le xylène

Toxicocinétique du xylène :

Comme pour les autres hydrocarbures aromatiques, la voie pulmonaire est la principale voie d'exposition du xylène. Pour les trois isomères existants (o-, p- et m-xylène), environ 65 % de la quantité inhalée est absorbée par les poumons. Le xylène liquide peut également être absorbé par la voie cutanée. La distribution de la molécule entre le sang et les différents organes cibles est rapide, avec un équilibre atteint au bout de 6 h après le début de l'exposition (Carpenter et al., 1975). En revanche, la durée de son absorption par les tissus adipeux est de quelques jours. La métabolisation a surtout lieu dans le foie (95 %) avec l'induction d'EMX telles que CYP2E1, CYP2B1, UDP-Glucuronosyltransférase (UGT) et GST (Kim et al., 2016). La première étape de biotransformation correspond à l'oxydation d'un groupement méthyl en acide méthylbenzoïque. Puis les principaux métabolites, les acides méthylhippuriques, sont formés par conjugaison de l'acide avec des molécules de glycine (figure 12) (Fishbein, 1985; INRS, 2009c). Ces métabolites sont excrétés dans l'urine, principale voie d'élimination (90 à 95 % du xylène absorbé) ou dans l'air exhalé (3 à 6 % du xylène absorbé). L'excrétion des acides méthylhippuriques par voie urinaire se passe en deux phases : une phase rapide et une phase plus lente correspondant aux molécules stockées dans les tissus adipeux (demi-vie d'environ 60 h).

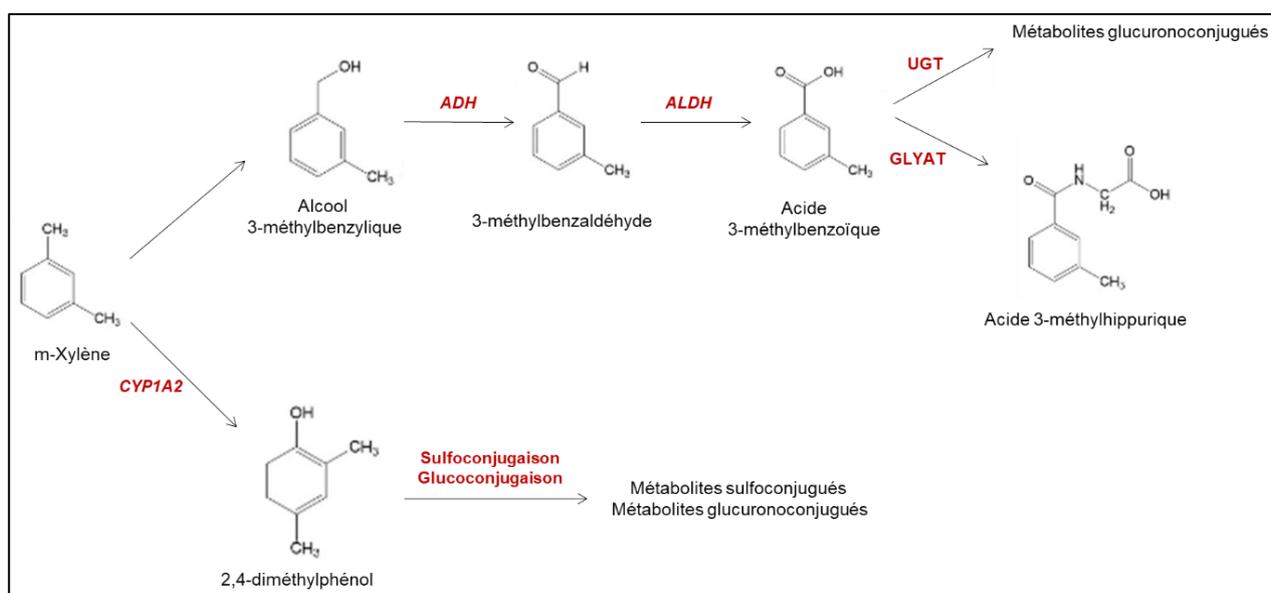


Figure 12 : Métabolisme du xylène (inspiré de Fishbein, 1985; INRS, 2009c)

Effets neurotoxiques :

Les travaux ayant pour objectif d'étudier les effets des xylènes sur l'apparition de symptômes neurologiques ne sont pas récents. Les principaux articles ont en effet été publiés dans les années 1970 et 1980. Les effets neurotoxiques du xylène sont similaires à ceux provoqués par les autres hydrocarbures aromatiques. Des expositions répétées par inhalation au m-xylène pour des concentrations allant de 100 à 400 ppm, ont provoqué une augmentation des temps de réaction et une altération de l'équilibre chez des sujets volontaires (Riihimäki and Savolainen, 1980). En parallèle, certains individus exposés ont été soumis à une période d'activité physique, entraînant l'augmentation des symptômes neurotoxiques par rapport aux individus sédentaires. Toutefois, les effets observés dans cette étude n'ont pas persisté dans le temps puisque le xylène a un temps de demi-vie, de l'ordre de 30 minutes à 1 heure. Beaucoup d'études sur les effets d'une exposition aux xylènes ont été réalisés sur des animaux (rats, lapins ou chiens). En 1975, Carpenter et al. ont réalisé des expositions chroniques sur des rats entraînant une perte de réflexes, une diminution du temps de réaction et une altération de la coordination (Carpenter et al., 1975).

Pathologies inflammatoires et allergiques :

Des enquêtes épidémiologiques ont fait le lien entre l'inhalation des xylènes et l'augmentation de pathologies inflammatoires du système respiratoire. Par exemple, les travaux de Billionnet et al. ont révélé que l'exposition aux 3 isomères du xylène augmentait le risque de développer des rhinites allergiques (Billionnet et al., 2011). L'exposition à ces trois isomères semble également induire un risque de développer un syndrome asthmatique. En effet, Delfino et al. ont observé une augmentation significative d'épisodes asthmatiques pour une cohorte d'enfants exposés aux xylènes (Delfino et al., 2003). Les xylènes sont également irritants pour la peau. Des peintres utilisant des pistolets à peinture ont ressenti des irritations sur certaines régions du corps, se traduisant par l'apparition de rougeurs (Chang et al., 2007).

Effets Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques :

Les xylènes n'auraient pas d'effets mutagènes. Les études *in vivo* et *in vitro* ont donné des résultats négatifs pour les tests réglementaires de mutagénicité (INRS, 2009c). En revanche, les données sur la toxicité de ces molécules sont insuffisantes pour pouvoir conclure sur son pouvoir reprotoxique. Toutefois, il a été prouvé que les xylènes ont la capacité de traverser la barrière placentaire chez les rats. Enfin, le CIRC a classé les 3 isomères de xylène dans le groupe 3 (agent inclassable quant à sa cancérogénicité sur l'Homme) car les résultats obtenus après exposition de rongeurs sont difficiles à interpréter.

2.3.4 Le mésitylène

Toxicocinétique du mésitylène :

Le mésitylène n'est pas un des COV parmi les plus étudiés en toxicologie. A ce jour, peu d'informations sur sa toxicité sont disponibles. Quelques études ont toutefois été effectuées sur des animaux ou sur des individus exposés en milieu professionnel ou lors d'expériences en milieu contrôlé. Après inhalation, le mésitylène est rapidement absorbé par l'organisme et s'accumule principalement dans les tissus adipeux (Saillenfait et al., 2005). Dans le foie, l'un de ses groupes méthyle est oxydé en acide diméthylbenzoïque. Celui-ci est ensuite conjugué à une molécule de glycine pour former l'acide 3, 5-diméthylhippurique (figure 13). Chez les rongeurs, plus de 90 % de la dose absorbée est excrétée par voie urinaire sous forme d'acide 3, 5-diméthylhippurique ou d'acide 3, 5-diméthylbenzoïque (INRS, 2004).

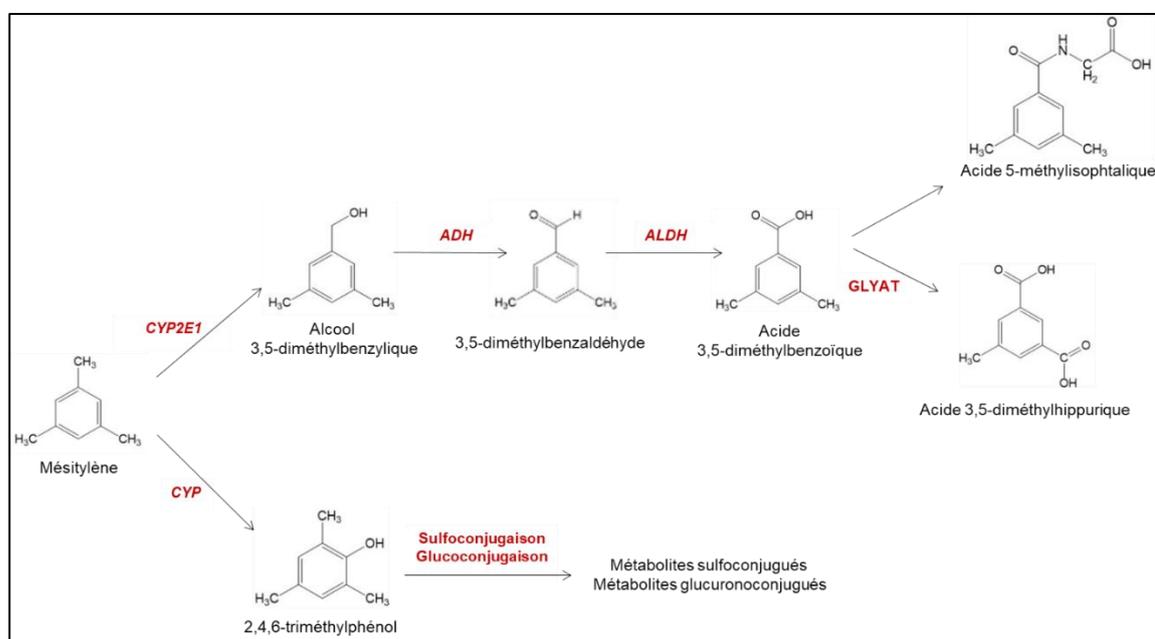


Figure 13 : Métabolisme du mésitylène (inspiré de INRS, 2004)

Effets neurotoxiques :

Très peu d'études scientifiques relatent l'effet neurotoxique de l'exposition humaine au mésitylène alors qu'à l'instar des autres solvants organiques de ce type, une dépression du SNC est suspectée. Une étude, datant de 1956 citée par l'INRS, a également permis d'examiner les effets à long terme du mésitylène. Les chercheurs se sont concentrés sur un groupe de 37 peintres exposés aux 3 isomères du triméthylbenzène pendant une durée de 7 ans (INRS, 2004). Des troubles neurologiques comme des maux de tête, de la somnolence, de l'anxiété, des pertes de la mémoire ou des troubles du comportement ont été observés pour 80 % des sujets.

Pathologies inflammatoires et allergiques :

L'exposition aiguë et chronique au mésitylène provoque des réactions inflammatoires similaires aux autres solvants organiques. D'après l'étude de 1956 sur le groupe de travailleurs du secteur de la peinture (INRS, 2004), les individus exposés ont également été atteints d'irritations des voies aériennes et de troubles ventilatoires (70 % des cas). Le mésitylène peut également être à l'origine de l'apparition de rougeurs et d'une sécheresse de la peau lors d'un contact cutané. Une projection oculaire du solvant peut également induire une irritation conjonctivale.

Effets Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques :

Aucune information n'est disponible concernant les effets CMR du mésitylène chez l'Homme. Chez l'animal, seul son pouvoir reprotoxique a été étudié chez des rates gestantes exposées par inhalation, 6 h par jour pendant 14 jours au mésitylène (1,3,5-triméthylbenzène) aux doses de 100, 300, 600 et 1200 ppm ou au pseudocumène (1,2,4-triméthylbenzène) aux doses de 100, 300, 600 et 900 ppm (Saillenfait et al., 2005). Une réduction significative du poids corporel du fœtus a été observée après exposition à des concentrations allant de 600 à 1200 ppm tandis qu'une diminution significative de la prise de poids de la mère et de la consommation de nourriture a été observée dès 300 ppm de mésitylène. Toutefois, aucun effet tératogène n'a été observé.

2.4 Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle des 4 COV d'étude

L'évaluation quantitative des risques sanitaires est un outil d'aide à la décision qui vise dans une situation d'incertitude à intégrer les connaissances disponibles afin de statuer sur le niveau de risque collectif pour la santé qu'induit une exposition à des substances dangereuses. La démarche d'évaluation implique les 4 étapes suivantes : (i) Identification des dangers, (ii) Définition des relations dose-réponse, (iii) Evaluation de l'exposition et (iv) Caractérisation des risques. Les deux premières étapes qui visent à caractériser le danger ont pour objectif la proposition de valeurs sanitaires de référence lorsque les données disponibles sur les substances considérées le permettent. Afin de prévenir les risques sur la santé provoqués par l'exposition aux xénobiotiques, ces valeurs sanitaires de référence peuvent être mises en place spécifiquement pour la population générale et pour le milieu professionnel. Ces valeurs constituent des indices toxicologiques qui permettent de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elles établissent le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Ces valeurs sont spécifiques d'une durée d'exposition et définies par rapport à une voie d'exposition. Elles sont construites en fonction des connaissances et des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances (ANSES, 2017b). Par exemple, pour un toxique par inhalation, la valeur sanitaire de référence représente la concentration dans l'air que devrait pouvoir respirer un individu sans que l'exposition ne provoque d'effets néfastes sur sa santé.

Concernant la population générale, deux valeurs sont distinguées selon le contexte : les Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) qui s'appliquent en environnement général à l'ensemble de la population, y compris les populations sensibles telles que les enfants et les Valeurs Guides de qualité d'Air Intérieur (VGAI) pour des polluants d'intérêt de l'air intérieur fréquemment recherchés dans les campagnes de mesure en France. C'est notamment le cas du toluène et du formaldéhyde. En milieu professionnel, trois valeurs limites de concentration atmosphérique d'un agent chimique dans la zone de respiration d'un travailleur peuvent être utilisées : la Valeur Limite à Court Terme (VLCT) est une valeur destinée à protéger les travailleurs des effets aigus induits lors de pics d'exposition. Elle se rapporte à une durée de référence de 15 minutes. La Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP), quant à elle, représente la valeur destinée à protéger des effets à moyen et long termes les travailleurs exposés régulièrement et pendant la durée d'une vie de travail à l'agent chimique considéré. Elle correspond ainsi à l'exposition moyenne pendant la durée classique d'un poste de travail, soit 8 h par jour. La troisième valeur est la valeur plafond, c'est-à-dire la concentration atmosphérique d'un agent chimique qui ne doit être dépassée à aucun moment de la période de travail. Cette valeur ne s'applique qu'aux substances reconnues comme fortement irritante ou corrosive ou pouvant causer un effet grave potentiellement irréversible, à très court terme.

Comme notre travail concerne 4 COV potentiellement utilisés dans des entreprises industrielles, les valeurs limites professionnelles sont reprises dans le tableau 7. Le benzène est l'hydrocarbure aromatique ayant la VLEP la plus faible, soit 1 ppm. Ce xénobiotique est un composé génotoxique direct qui, lors de son absorption, se fixe sur l'ADN. Il est ainsi considéré comme cancérigène sans seuil, c'est-à-dire qu'il n'existe aucun niveau d'exposition déterminé au-dessous duquel il n'y aurait pas de risque. Sa VLEP a été déterminée suite à une recommandation formulée à l'échelle européenne par le Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL). Ainsi, la valeur limite d'exposition devrait être inférieure à 1 ppm afin d'éviter les effets hématotoxiques et diminuer le risque de leucémie chez les travailleurs (SCOEL, 1991). En revanche, les membres du SCOEL ont estimé qu'il n'était pas nécessaire de fixer une VLCT. En effet, la toxicité aiguë du benzène au niveau du SNC n'apparaîtrait qu'à des doses comprises entre 300 à 3 000 ppm, concentrations ne pouvant pas être utilisées dans le secteur professionnel au vu de la valeur de la VLEP. Il est important de signaler qu'en 2018, l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA) a pris en considération les connaissances issues de la littérature scientifique afin de vérifier la pertinence de ces valeurs d'exposition. A la suite de cette synthèse bibliographique, le Comité de Gestion des Risques (RAC) de l'agence recommande une VLEP moyenne de 0,05 ppm en raison d'une génotoxicité au niveau des cellules mononuclées du sang périphérique chez les travailleurs exposés à la dose de 1 ppm en tenant compte de la variabilité inter-individuelle, de l'utilisation d'une Lowest Observed Adverse Effect (LOAEC) ainsi que de l'existence de cellules potentiellement plus sensibles que les cellules sanguines périphériques. En ce qui concerne le toluène et le xylène, ceux-ci possèdent la même VLCT (100 ppm) mais des VLEP différentes avec des concentrations

respectives de 20 et 50 ppm. Ces valeurs sont dites valeurs sanitaires puisqu'elles sont issues d'une extrapolation en utilisant des facteurs d'incertitude. Ainsi pour le toluène, l'effet critique est l'effet neurosensoriel avec une altération de la vision à partir d'une exposition de 40 ppm (AFSSET, 2008). Un facteur de sécurité égal à 2 a été utilisé pour déterminer la VLEP puisque celle-ci provient de l'extrapolation de la concentration la plus basse à laquelle un effet néfaste a été observé (LOAEL) et non de l'extrapolation de la concentration maximale n'ayant pas observé d'effet néfaste (NOAEL). Par conséquent, une VLEP de 20 ppm a été retenue tandis que la VLCT du toluène a été fixée, en accord avec les recommandations du SCOEL, à 100 ppm afin d'éviter la toxicité neurocomportementale de ce COV (AFSSET, 2008). Concernant le xylène, les valeurs réglementaires ont également été choisies en accord avec les recommandations du SCOEL en considérant comme effets critiques l'irritation modérée de l'œil et des voies aériennes supérieures ainsi que des effets sur le SNC à partir de la dose de 100 ppm (SCOEL, 1992). Enfin, les valeurs limites réglementaires du mésitylène sont plus faibles ou égales à celles fixées pour le toluène et le xylène. En effet, la VLEP est égale à 20 ppm et a été déterminée à partir de la NOAEL de 165 ppm en considérant un facteur d'incertitude d'environ 5 en raison d'une potentielle reprotoxicité chez les rongeurs et de l'absence de données disponibles chez l'Homme (SCOEL, 1994). Pour la VLCT, aucune recommandation n'a été formulée par le SCOEL. Cependant, au niveau national, un groupe d'experts français sous la tutelle du ministère chargé du travail a proposé une VLCT de 50 ppm. Cette proposition est fondée en considérant comme effet critique l'irritation des voies respiratoires, comme dose critique la dose absorbée par voie respiratoire induisant une diminution de 50 % de la fréquence respiratoire (RD_{50}) de 578 ppm et en utilisant un facteur d'incertitude de 10 (Korsak et al., 1995). Le mésitylène (1,3,5-triméthylbenzène) est l'un des principaux substituants du benzène et du toluène. Il est donc très présent dans les atmosphères de travail et les travailleurs y sont exposés de manière chronique. Ces faibles concentrations permettent donc de protéger les travailleurs des effets toxiques à court et à long terme.

Tableau 7 : Valeurs limites d'exposition professionnelle des composés étudiés

		Benzène	Toluène	Xylène	Mésitylène
Dates		1997	2012	2007	2007
Effets critiques		Génotoxicité	Reprotoxicité, neurotoxicité, toxicité comportementale et du développement	Irritation et effets sur le SNC	Irritation des yeux et des voies respiratoires chez le rat
VLCT (15 min)	Dose critique	/	100 ppm	100 ppm	500 ppm
	Facteur d'incertitude	/	/	/	10
	Valeur	1 ppm	100 ppm	100 ppm	50 ppm
VLEP (8 h)	Dose critique	1 ppm	40 ppm	100 ppm	165 ppm
	Facteur d'incertitude	/	2	2	5
	Valeur	1 ppm	20 ppm	50 ppm	20 ppm

3. Toxicologie expérimentale des COV

Les études chez l'Homme ont mis en évidence des effets néfastes multiples suite à une exposition aux COV. Les 4 hydrocarbures aromatiques d'intérêt, que sont le benzène, le toluène, le m-xylène et le mésitylène sont notamment impliqués dans la survenue d'allergies et de maladies respiratoires non cancéreuses. Afin de compléter ces observations et de comprendre les mécanismes sous-jacents de l'apparition de ces pathologies suite à l'exposition aux COV, des études expérimentales ont été menées par la communauté scientifique. Dans cette partie seront présentés les résultats de ces études sur la toxicité des COV, en insistant sur les méthodologies employées visant à simuler une exposition réaliste. Les méthodes *in vivo* permettent d'évaluer les risques sanitaires liés à l'exposition par inhalation de polluants atmosphériques. Toutefois dans un souci éthique, ces techniques utilisant des modèles humains ou animaux tendent à être remplacées par des méthodes dites alternatives, c'est-à-dire permettant l'application du principe des 3R (Remplacement, Réduction and Refinement ou Remplacer, Réduire et Raffiner) comme par exemple l'utilisation de procédés *in vitro*. Grâce aux évolutions techniques de ces deux dernières décennies, de nouveaux dispositifs d'exposition ont été développés, afin de se rapprocher des conditions réelles par inhalation. Ces modèles dits « biphasiques » permettent de reproduire l'interface air-liquide qui existe dans le poumon.

3.1 Les méthodes *in vivo*

3.1.1 Les études humaines en milieu contrôlé

Les méthodes *in vivo* réalisées sur l'Homme en milieu contrôlé reposent sur l'exposition de volontaires grâce à des masques positionnés sur la bouche ou le nez des sujets ou dans des chambres d'exposition. Contrairement aux enquêtes épidémiologiques, cette technique permet de contrôler et quantifier les niveaux d'exposition des individus (Utell and Frampton, 2000). En revanche, ces études ne sont pas représentatives de la réalité puisque les durées d'exposition ne dépassent pas quelques heures et les concentrations administrées sont souvent supérieures à celles présentes dans les microenvironnements intérieurs et extérieurs. De plus, elles ne prennent en compte qu'un petit nombre de participants, souvent inférieur à 20. Enfin, toutes les molécules ayant des propriétés CMR connues, comme par exemple le benzène, ne peuvent pas être testées. D'après Utell et Frampton, les principaux paramètres évalués lors de ces travaux sont :

- le statut respiratoire grâce à des tests spirométriques mesurant la Capacité Vitale Forcée (CVF), le Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) et le Débit Expiratoire Maximal Médian (DEMM) ;
- l'analyse des fluides bronchiques recueillis après expectoration, fibroscopie bronchique ou lavage bronchiolo-alvéolaire ;
- la mesure de biomarqueurs inflammatoires ou du stress oxydant dans les prélèvements sanguins ;
- l'analyse de métabolites urinaires.

Dans la littérature, quelques études relatent certains effets de l'exposition humaine en milieu contrôlé à des COV, seuls ou en mélange. L'étude de Janasik et al. avait par exemple pour objectif d'étudier la cinétique d'élimination dans les urines de 4 hydrocarbures aromatiques (toluène, éthylbenzène, xylène et mésitylène) sous leur forme non métabolisée (Janasik et al., 2008). Grâce à ces expériences réalisées sur 6 volontaires sains pendant 4 h, ils ont pu constater que les molécules initiales excrétées dans l'urine étaient de bons marqueurs de l'exposition professionnelle aux solvants aromatiques. Ainsi, la quantification des COV inchangés dans l'urine permet d'éliminer les problèmes liés à la première phase d'élimination des métabolites et ainsi d'avoir un résultat d'exposition plus rapide. Des études ont également traité des effets de l'exposition professionnelle des peintres en industrie. Après exposition à un mélange de 5 COV (propylène glycol, texanol, éther monoéthylique, éther monobutylique et éther méthylique) à une concentration de 35 mg.m^{-3} , les 30 volontaires comprenant des individus sains non peintres avec ou sans symptômes atopiques et des professionnels, ont ressenti des irritations des yeux et des voies aériennes supérieures, un gonflement de la muqueuse nasale ainsi que des difficultés respiratoires (Ernstgard et al., 2007). Une quantification des marqueurs inflammatoires MPO (myéloperoxydase), IL-8 (interleukine 8), PEC (protéine éosinophile cationique), lysozyme et albumine a également été réalisée dans les fluides de lavage nasal. Toutefois,

aucune modification dans les concentrations de ces biomarqueurs n'a été observée après exposition aux COV.

Les symptômes d'irritation et d'inflammation des voies pulmonaires observés lors des expositions humaines aux COV en milieu contrôlé sont en accord avec les résultats obtenus lors des enquêtes épidémiologiques. Grâce au contrôle des concentrations d'exposition et à la sélection des volontaires selon leur état de santé (sains ou atteints de pathologies respiratoires), ces méthodes *in vivo* permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action des polluants gazeux sur le système respiratoire. Toutefois, l'impossibilité d'effectuer des expositions chroniques ainsi que des prélèvements invasifs notamment par biopsie des tissus de l'appareil respiratoire constitue une limite dans l'étude des mécanismes d'action toxique de ces polluants atmosphériques. L'utilisation de modèles animaux peut dans certains cas permettre de compenser cet obstacle.

3.1.2 Les modèles animaux

Des modèles animaux sont régulièrement utilisés dans les études toxicologiques sur les COV. Les organismes les plus souvent utilisés sont les rongeurs, comme les souris, les hamsters ou les rats. Deux dispositifs permettent l'exposition des animaux aux polluants gazeux atmosphériques (figure 14) : l'utilisation d'une chambre d'exposition pouvant contenir l'animal ou l'exposition directe du système respiratoire par le nez ou la bouche (Bakand and Hayes, 2010). Ces méthodes *in vivo* permettent d'apporter des informations supplémentaires à celles effectuées sur les humains en milieu contrôlé, puisque les protocoles d'exposition peuvent être réalisés de manière répétée. Ces études suppriment également le biais provoqué par la variabilité génétique et les différences de mode de vie des participants. De plus, les résultats obtenus lors des expérimentations peuvent être comparés les uns avec les autres, car l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques a mis en place des protocoles standardisés pour les tests d'inhalation aigus, répétés (14 à 28 jours) ou subchroniques (jusqu'à 90 jours)(OECD, 2018). Toutefois, l'utilisation de ces méthodes présente quelques limites. Tout d'abord, la transposition à l'Homme des mécanismes d'action des COV n'est pas toujours réalisable puisque certains modèles, comme par exemple les rongeurs, ont des caractéristiques pulmonaires différentes de celles de l'Homme (Bakand and Hayes, 2010). De plus, le stress induit par l'expérimentation peut provoquer un biais dans l'évaluation des effets des expositions. Enfin, ce sont des expériences onéreuses puisqu'elles nécessitent l'utilisation de plusieurs dizaines d'animaux lors de chaque expérimentation pour une bonne reproductibilité, ainsi que du matériel de génération des gaz et d'exposition spécifique.

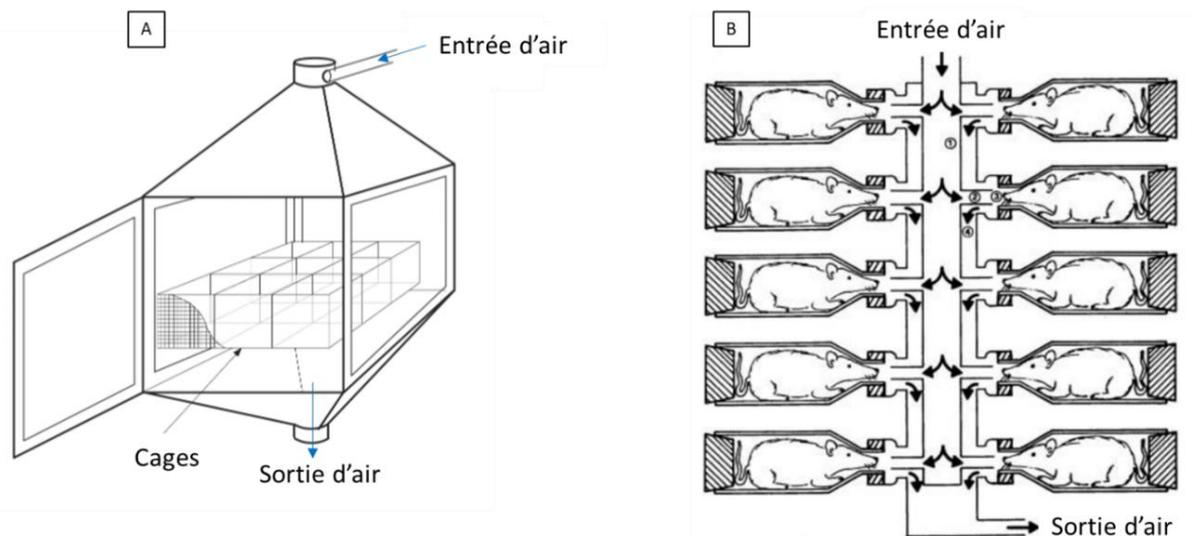


Figure 14 : Dispositifs d'exposition *in vivo* aux polluants atmosphériques : exposition du corps entier (A) ou exposition par voie respiratoire (B) (d'après Chen and Lippmann, 2015; Wong, 2007)

D'autres études *in vivo* ont permis de comprendre la toxicocinétique des hydrocarbures après inhalation. C'est le cas des travaux de Swiercz et al. qui ont analysé la distribution et l'élimination du mésitylène (25, 100 et 250 ppm) chez des rats (Swiercz et al., 2006). Les expérimentations ont été réalisées dans des chambres d'exposition selon 2 modes d'exposition : aigu (6 h) ou chronique (6 h/jour, pendant 5 jours/semaine, durant 4 semaines). Les résultats ont révélé une augmentation du mésitylène et de son métabolite, l'acide 3,5-diméthylbenzoïque (3,5-DMBA) dans le sang et dans les tissus lors des expositions au COV, avec une plus forte concentration lors des expositions répétées par rapport à l'exposition unique. Après la fin des expositions, le métabolite a rapidement été éliminé de l'organisme des rats, ne mettant pas en évidence un effet de rétention dans les tissus adipeux. Le mésitylène n'est également pas accumulé dans les poumons puisqu'une plus faible concentration a été mesurée dans l'organe lors d'une exposition répétée en comparaison d'une exposition unique. En revanche, le métabolite 3,5-DMBA est plus présent dans les poumons dans le cas de l'exposition chronique, ce qui s'explique par l'activité d'enzymes métabolisant le mésitylène induites dès la première exposition. Des études ont également évalué les réactions métaboliques provoquées par une co-exposition au benzène et au toluène de rats mâles (Purcell et al., 1990). Les rongeurs ont été exposés pendant 6 h à deux mélanges différents : 200 ppm de benzène et 1 000 ppm de toluène ou 1 000 ppm de benzène et 200 ppm de toluène. Les résultats obtenus ont ainsi montré une diminution de la transformation métabolique des deux composés lors de l'inhalation du mélange par rapport au métabolisme des molécules seules. De plus, une inhibition du métabolisme du benzène plus importante que celle du toluène a été observée. Ces observations suggèrent donc que les deux molécules entrent en concurrence en tant que substrat lors de la première phase de métabolisation réalisée par les CYP.

Tout comme les enquêtes épidémiologiques, les essais utilisant des modèles animaux ont également démontré les effets inflammatoires des COV sur le système respiratoire. Par exemple, les travaux de Wang et al. avaient pour objectif d'analyser l'effet d'une exposition subchronique sur l'apparition ou l'amplification de l'inflammation pulmonaire (Wang et al., 2014). 40 souris mâles ont ainsi été exposées 2 h/jour pendant 90 jours, à un mélange composé de 4 COV (benzène, toluène, xylène et formaldéhyde). Après exposition, les chercheurs ont ainsi mesuré dans les poumons et dans les liquides de lavage bronchiolo-alvéolaire, une augmentation significative de marqueurs liés à l'inflammation comme les interleukines 8 et 4, ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les études *in vivo* peuvent également évaluer la survenue d'effets neurotoxiques lors d'expositions subchroniques afin de pallier le manque d'études chez l'Homme. Ainsi, l'équipe de Wiarderna a étudié l'impact du mésitylène sur des rats mâles (Wiarderna et al., 2002). Ainsi, les animaux ont été exposés par inhalation à différentes concentrations : 25, 100 ou 250 ppm pendant 6 h/jour, 5 jours/semaine et durant 4 semaines. Les tests ont été effectués plusieurs jours après les séries d'exposition afin de comprendre les effets à long terme du mésitylène. L'exposition à ce composé entraîne des modifications à long terme sur le système nerveux du rat comme une augmentation du stress ou une perte de réaction quelle que soit la concentration d'exposition.

Pour finir, l'étude de Hudák et Ungváry a eu pour objectif de comparer l'effet tératogène du benzène et de ses homologues supérieurs, le toluène et le xylène (Hudák and Ungváry, 1978). L'exposition de rates aux trois solvants, pendant toute la durée de la gestation, a induit une augmentation des malformations squelettiques tandis que le benzène et le toluène ont entraîné un retard de développement du fœtus. Cette étude a permis de déterminer les doses en hydrocarbures aromatiques nocives pour la gestation et ainsi prévenir des dangers encourus par les travailleurs, notamment les femmes, lors d'une exposition à ces composés volatils.

3.2 Le principe des 3R

Que ce soit pour des raisons éthiques, scientifiques ou économiques, l'utilisation des modèles animaux dans les études toxicologiques est de moins en moins fréquente. La notion de remplacement des animaux a été évoquée pour la première fois en 1957 par deux scientifiques anglais : Charles Hume et William Russel (Balls, 1994). Les deux chercheurs ont ainsi développé un concept bioéthique pour une utilisation plus responsable des animaux dans les laboratoires, nommé le « principe des 3R » qui reprend les initiales de Replacement (remplacer), Reduction (réduire) et Refinement (raffiner) (Doke and Dhawale, 2015) :

- Le premier principe préconise le remplacement du modèle *in vivo* par des procédés *in vitro* (culture cellulaire) ou *in silico* (bio-informatique) (Balls, 2002). L'un des meilleurs exemples de remplacement concerne l'industrie cosmétique, où les lapins initialement utilisés pour les tests d'irritation de la peau et des yeux ont été remplacés par des tissus cellulaires d'origine cutanée (Doke and Dhawale, 2015). Pour certaines expériences, les modèles animaux vertébrés peuvent également être substitués par d'autres organismes comme des invertébrés (drosophiles ou cnidaires), des vertébrés aquatiques (zebrafish) ou des microorganismes (procaryotes ou mycètes).
- Le principe de réduction repose sur l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, lorsque ces derniers sont indispensables à l'expérimentation. Cette réduction peut se faire en ne réalisant que les expériences nécessaires et en diminuant le nombre de répétitions. Toutefois, afin d'éviter que les résultats soient statistiquement inexploitable, une estimation du nombre d'animaux doit être effectuée avant le début de l'étude.
- Le dernier principe a pour objectif d'améliorer le bien-être des animaux de laboratoire en respectant leur comportement naturel et en leur imposant le moins de contraintes possibles (Flecknell, 1994). Le concept de raffinement préconise par exemple d'éviter les tests douloureux, de préférer les expositions aiguës aux expositions chroniques ou encore d'utiliser des tests non invasifs. D'un point de vue scientifique, ce concept est d'autant plus important puisque l'augmentation du stress chez les animaux peut provoquer un déséquilibre hormonal entraînant des fluctuations dans les résultats (Doke and Dhawale, 2015).

Le principe des 3R a été adopté dans les législations européennes (directive n° 2010/63/UE) et françaises (décret n° 2013-118 et arrêtés du 1er février 2013). De plus, l'Union Européenne a créée en 1991 le Centre Européen pour la Validation des Méthodes Alternatives (ECVAM) avec pour objectif de développer et valider les méthodes alternatives à l'utilisation des animaux en laboratoire. En 2011, il est devenu le laboratoire européen de référence pour les méthodes alternatives en expérimentation animale (EURL ECVAM). Les principales missions de l'organisme sont : (i) collaborer aux recherches européennes et internationales, (ii) coordonner et réaliser des méthodes alternatives pour l'évaluation de la toxicité des produits chimiques, et (iii) faire le lien entre les industries et les centres de recherche pour promouvoir le principe des 3R.

3.3 Les méthodes *in vitro*

D'après Gałęzowska et al., plusieurs paramètres sont à prendre en compte lors de l'étude *in vitro* de l'impact des polluants gazeux atmosphériques sur l'appareil respiratoire (Gałęzowska et al., 2016). Ces conditions expérimentales, définies selon la problématique posée, correspondent au choix du modèle cellulaire, au choix du système d'exposition et de génération des mélanges atmosphériques et à l'évaluation de l'activité cellulaire.

3.3.1 Les modèles cellulaires

Différents modèles cellulaires sont utilisés dans les études *in vitro* visant à évaluer l'impact des polluants atmosphériques sur l'appareil respiratoire humain. Ces derniers sont répartis en trois groupes : les monocultures, les co-cultures et les cultures de tissus. Ils peuvent être formés de différents types de cellules (macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules dendritiques et monocytes), prélevées le long du système respiratoire.

L'épithélium pulmonaire recouvre la totalité de la surface des voies respiratoires et est donc en contact direct avec les xénobiotiques présents dans l'air inhalé (Hiemstra et al., 2015). Les monocultures de cellules épithéliales peuvent donc être un choix pertinent pour l'étude des effets des polluants atmosphériques sur le système pulmonaire. Elles peuvent provenir de lignées ou de cultures primaires de cellules.

Les lignées de cellules épithéliales sont les modèles les plus utilisés lors des expérimentations *in vitro* car elles offrent plusieurs avantages. Premièrement, elles sont faciles à manipuler et leur culture est relativement peu coûteuse. Deuxièmement, elles proviennent du même donneur, permettant une reproductibilité des expériences. Enfin, elles sont issues de cellules cancéreuses ou de cellules transformées par un virus hybride, ce qui leur confère une longue durée de vie. Actuellement, 5 lignées cellulaires (3 lignées bronchiques et 2 lignées alvéolaires) sont régulièrement utilisées dans les travaux sur la toxicité des polluants gazeux (BéruBé et al., 2009; Zscheppang et al., 2018) :

- Les cellules A549 (ATCC® CCL-185™) sont dérivées d'un adénocarcinome alvéolaire humain d'un homme de 58 ans. Elles sont capables de produire des protéines du surfactant mais ne forment pas de jonctions serrées en culture.
- La lignée cellulaire NCI-H441 (ATCC® HTB-174™) provient d'un adénocarcinome humain, également prélevé au niveau des alvéoles. En plus de sécréter des mucines, ces cellules forment des jonctions étroites et peuvent donc être utilisées dans les études de transport ionique.
- Les cellules Calu-3 (ATCC® HTB-55™) sont également issues d'un adénocarcinome, mais prélevées au niveau des bronches d'un patient âgé de 25 ans. En culture, ces dernières sécrètent des protéines du

mucus. Toutefois, comme les cellules A549, l'origine cancéreuse de cette lignée cellulaire peut poser problème puisqu'elles ont des caractéristiques phénotypiques différentes par rapport aux cellules normales.

- La lignée BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) correspond à des cellules épithéliales bronchiques humaines isolées chez un donneur sain, transformées par un virus hybride puis clonées. Elles ont des caractéristiques proches des cellules épithéliales basales mais ne forment pas de jonctions serrées.
- Les cellules 16 HBE-14o- (Merck® SCC150) proviennent d'un sujet âgé de 1 an et ont subi la même transformation que les cellules BEAS-2B. Ces cellules sont capables de produire des cils lors de leur culture en Interface Air/Liquide (ALI) et de former des jonctions serrées. Toutefois, elles ne sécrètent pas de mucus.

L'utilisation des lignées cellulaires peut toutefois limiter l'interprétation des résultats obtenus puisque leur génotype (cancéreux ou transformé) est différent de celui des cellules bronchiques ou alvéolaires présentes physiologiquement chez un individu sain. Les cellules primaires, non cancéreuses et non transformées permettent de palier ce problème. Ces dernières sont des cellules normales, directement prélevées d'un système pulmonaire humain pour être mises en culture. Elles conservent donc des caractéristiques phénotypiques et métaboliques proches des cellules *in vivo*. En culture, ces modèles ont la capacité de former des cellules ciliées et des jonctions serrées, ainsi que de sécréter du mucus. De plus, elles peuvent provenir de donneurs ayant des pathologies respiratoires, comme des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) ou de l'asthme. Cependant, elles sont peu utilisées car chaque lot cellulaire a une variabilité génétique élevée, rendant plus difficile la comparaison des résultats entre différentes études. Ces monocultures peuvent être prélevées au niveau de la région nasale, proximale (trachée et bronches) ou distale (alvéoles) du système pulmonaire :

- Les cellules NHBE (Normal Human Bronchial Epithelial Cells) (Lonza™ CC-2450) et les cellules hAECB (human Airway Epithelial Cells of Bronchial origin) (Epithelix™) sont des cellules primaires d'épithélium bronchique. Elles peuvent être obtenues par biopsie ou lors de dissections.
- Les cellules hAECN (human Airway Epithelial Cells of Nasal origin) (Epithelix™) proviennent quant à elles d'un épithélium nasal. Ces cellules primaires sont obtenues par brossage des cornets nasaux ou par biopsie.

Le deuxième système cellulaire manipulé dans les études *in vitro* correspond aux co-cultures. Ces modèles, formés de plusieurs types cellulaires permettent des interactions entre les différentes cellules présentes dans le poumon. Les modèles en co-culture les plus utilisés d'après la littérature sont formés d'au moins deux types cellulaires et peuvent associer des cellules épithéliales avec des cellules immunitaires

comme les macrophages alvéolaires (BéruBé et al., 2009). Par exemple, Loret et al. (2016) ont mimé la partie apicale des alvéoles en ensemençant des macrophages dérivés de THP-1 avec des cellules épithéliales A549 avant de les exposer à des nanomatériaux de dioxyde de titane et de dioxyde de cérium (Loret et al., 2016). Ishii et al. ont utilisé une co-culture formée par des macrophages alvéolaires et des cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEC) afin d'étudier les effets toxiques des particules fines atmosphériques (PM_{2.5}) (Ishii et al., 2005). Plus récemment, des co-cultures ont été étudiées avec plus de 2 types cellulaires différents. Par exemple, Tomasek et al. ont construit un modèle multicellulaire avec la lignée cellulaire A549 associée avec des macrophages dérivés de monocytes et des cellules dendritiques (Tomašek et al., 2018). Des marqueurs du stress oxydant et de la réponse pro-inflammatoire ont été mesurés après exposition en ALI des cellules à un mélange de particules provenant d'une source naturelle (cendres de volcan) et d'une source anthropique (gaz d'échappement de véhicules à essence). Fizeşan et al. ont mimé la barrière alvéolaire à partir de 4 types cellulaires différents (Fizeşan et al., 2018). Pour élaborer ce modèle cellulaire, des cellules épithéliales alvéolaires A549 et endothéliales Ea.hy 296 ont tout d'abord été mises en culture sur des membranes microporeuse appelées inserts de culture (Transwell® Corning®). Après 4 jours de culture, des cellules THP-1 différenciées en macrophages et des mastocytes HMC-1 ont étéensemencés sur la phase apicale de la bi-culture. 24 h après l'ensemencement, la tétra-culture a été exposée à des particules de gaz d'échappement de diesel à l'aide d'un système d'exposition en ALI (Vitrocell®). Par la suite, la mortalité cellulaire, le stress oxydant et la réponse pro-inflammatoire ont été mesurés.

Actuellement, les modèles tissulaires sont les meilleures reproductions *in vitro* de l'épithélium pulmonaire humain. En effet, ces tissus sont reconstitués à partir de cellules primaires pulmonaires et sont composés d'une multicouche de cellules épithéliales dont les cellules ciliées et les cellules sécrétrices de mucus. Ces modèles 3D peuvent être fournis par des sociétés qui les commercialisent ou peuvent être reconstitués en laboratoire. A l'heure actuelle, 3 reconstitutions d'épithélium humain sont disponibles sur le marché : EpiAirway de la société MatTek®, MucilAir® de la société Epithelix® et les cultures 3D de la société Lonza®. Ces tissus cellulaires proviennent d'un ou de plusieurs donneurs sains ou malades (asthmes, BPCO, fumeurs, rhinites allergiques). En laboratoire, l'élaboration de ces tissus différenciés est obtenue par culture en interface air-liquide. Grâce à cette méthode, des cellules primaires épithéliales sont cultivées sur des inserts. Ce dispositif de culture biphasique permet l'échange de milieu de culture entre la partie apicale et la partie basale des cellules. Lorsque ces dernières sont à confluence, le milieu de la phase apicale est retiré et les cellules sont conservées avec du milieu de culture, uniquement du côté basal. Après 3 à 4 semaines de culture en ALI, les cellules primaires forment un épithélium différencié avec des cellules basales et ciliées et sécrètent du mucus (BéruBé et al., 2009; Fulcher and Randell, 2012). L'avantage majeur de ces modèles est de mimer l'organisation de l'appareil respiratoire humain avec la production de mucus et la présence de cils vibratiles. De plus, leur durée de vie supérieure à 6 mois permet la réalisation d'expositions chroniques.

Des modèles complexes d'organoïdes et de poumons sur puces sont actuellement en développement principalement pour des applications médicales et des études physiologiques mais leur utilisation en toxicologie reste marginale à l'heure actuelle.

3.3.2 Les systèmes d'exposition

La principale contrainte des expériences *in vitro* est de mimer le plus fidèlement possible les conditions réelles d'exposition par inhalation. Certains critères doivent donc être pris en compte lors de l'élaboration d'un test toxicologique (Rasmussen, 1984). Premièrement, les concentrations en xénobiotiques doivent être connues et contrôlées tout le temps de l'exposition. Deuxièmement, l'expérience maintenue dans des conditions stériles doit permettre un contact direct entre les polluants et les cellules afin d'éviter les interactions avec le milieu de culture. Troisièmement, le temps d'exposition doit être suffisamment long pour permettre une induction des biomarqueurs tels que des protéines.

Dans de nombreuses études, l'exposition des cellules à des particules ou à des gaz se fait en condition immergée. Les cellules, adhérentes ou non, sont cultivées dans le milieu de culture et sont exposées aux toxiques qui y sont introduits. Cette technique est facile à mettre en œuvre et est peu coûteuse. Toutefois, l'utilisation de cette méthode a plusieurs inconvénients. Tout d'abord, cette méthodologie peut entraîner une erreur dans l'évaluation de la toxicité des polluants en surestimant ou en sous-estimant le niveau d'exposition. En effet, les concentrations utilisées sont souvent supérieures à celles mesurées dans l'air atmosphérique et les xénobiotiques peuvent entrer en interaction avec les molécules du milieu de culture, comme par exemple les protéines du sérum et donc les rendre inactifs vis-à-vis des cellules (Bakand and Hayes, 2010). Enfin, les cellules étant conservées dans un environnement à 37°C, il y a un risque d'évaporation des xénobiotiques, surtout si ces derniers sont très volatils comme par exemple le benzène ou le toluène.

Des techniques, dites par intermittence, peuvent également être utilisées lors d'expositions à des polluants gazeux. Elles sont réalisées à l'aide de plateaux oscillants ou de bouteilles rotatives (figure 15). Elles permettent donc une exposition des cellules plus directe que les méthodes immergées mais néanmoins discontinue puisque les cellules sont recouvertes par le milieu, la moitié du temps de l'expérimentation. Ces dispositifs sont donc actuellement peu utilisés puisqu'ils ont les mêmes inconvénients que les méthodes indirectes comme les interactions xénobiotiques/milieu de culture (Bakand and Hayes, 2010).

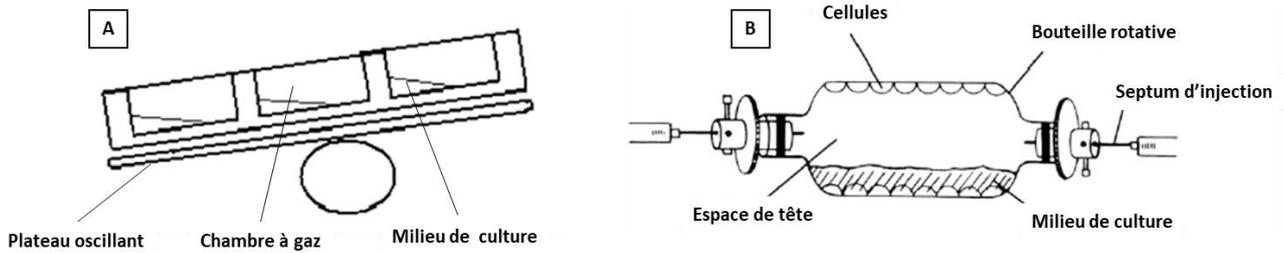


Figure 15 : Techniques d'exposition par intermittence à l'aide de plateaux oscillants (A) ou de bouteilles rotatives (B) (d'après Bakand and Hayes, 2010)

Afin de pallier les limites des méthodes d'exposition précédemment décrites, des systèmes d'exposition en interface air-liquide ont été conçus. Avec ces dispositifs d'exposition biphasique, les différents modèles cellulaires sont cultivés sur inserts permettant d'exposer directement la face apicale des cellules avec les gaz tandis que le milieu de culture se situe du côté basal (Aufderheide, 2005). Bien qu'aucune méthode n'ait été validée par les instances réglementaires, plusieurs recommandations ont été publiées récemment (Lacroix et al., 2018). L'exposition peut être effectuée statiquement, c'est-à-dire que les cellules sont exposées à un volume défini de composés gazeux injectés dans une enceinte close ou dynamiquement, c'est-à-dire que le composé d'intérêt est dilué dans un flux continu de gaz porteur (figure 16). La technique dynamique offre l'avantage de pouvoir changer la concentration des substances en augmentant ou en diminuant la quantité d'air dans le mélange et ainsi recréer une situation de pics de pollution (Gałęzowska et al., 2016).

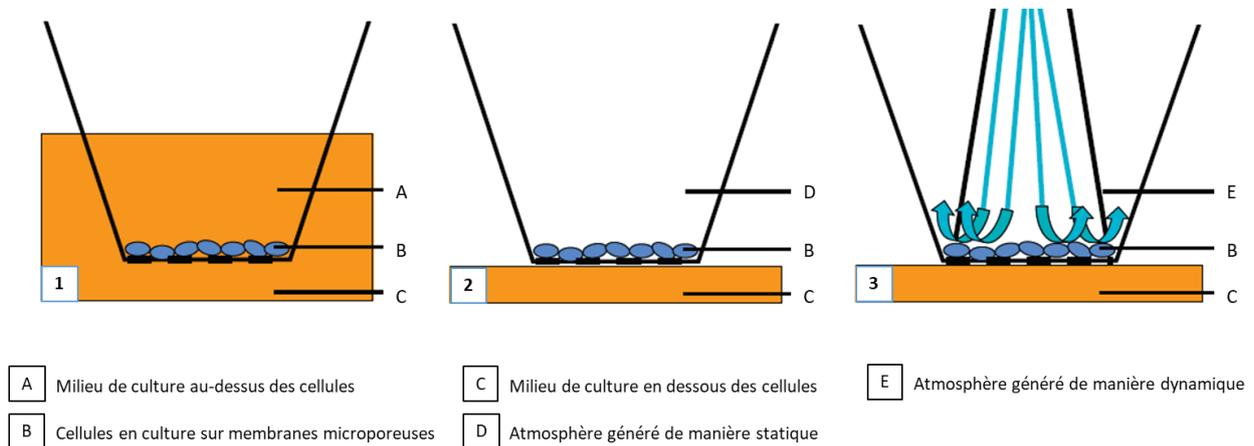


Figure 16 : Culture (1) et exposition cellulaire en Interface Air-Liquide de manière statique (2) ou dynamique (3) (d'après Aufderheide, 2008)

L'exposition en flux peut être réalisée soit en plaçant les cultures sur inserts dans des chambres d'exposition soumises au flux continu d'un mélange atmosphérique (Barraud et al., 2017) soit en utilisant des systèmes permettant l'exposition individuelle des inserts. Les systèmes d'exposition les plus utilisés sont commercialisés sous les dénominations Vitrocell® (figure 17) et Cultex®. Les cellules pulmonaires sont mises en contact avec un flux dynamique de gaz ou de particules, permettant ainsi de mimer les conditions d'exposition par inhalation présentes naturellement dans le poumon humain. De plus, les inserts sont installés dans des modules maintenus à 37°C permettant des temps d'exposition élevés, jusqu'à 6 h selon certaines études (Hiemstra et al., 2015). Au-delà, le manque de milieu sur la partie apicale assècherait les cellules et occasionnerait stress supplémentaire ce qui induirait un biais dans les résultats.

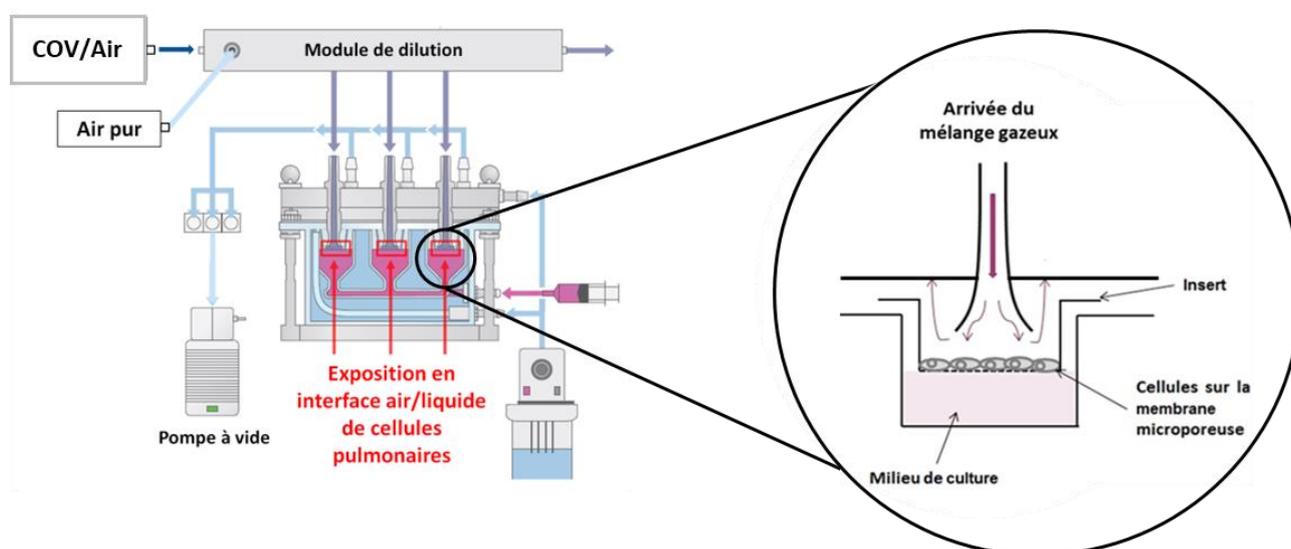


Figure 17 : Le système d'exposition en Interface Air-liquide Vitrocell®

En fonction des caractéristiques des polluants étudiés, d'autres systèmes d'exposition ALI ont été développés (figure 18). Par exemple, le système d'exposition cellulaire en interface air-liquide ALICE est utilisé spécifiquement pour l'analyse des effets des nanoparticules (Lenz et al., 2009), tandis que le dispositif EAVES (Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure system) a été créé pour augmenter le dépôt des particules sur la surface des cellules épithéliales (de Bruijne et al., 2009). Par ailleurs, Liu et al. ont confectionné un système basé sur la méthode « Hanging Drop » permettant d'exposer les cellules sur de longues périodes (Liu et al., 2013). Dans ce dispositif, les cellules sont cultivées dans une goutte de milieu de culture qui est elle-même mise sur une surface collante de la partie supérieure d'un module. Ce dernier contient l'air et les composés gazeux d'intérêt. Avec l'effet de la gravité, les cellules sont recueillies au fond de la goutte et ne sont recouvertes que par un petit film de milieu. Elles sont ainsi exposées directement au compartiment gazeux.

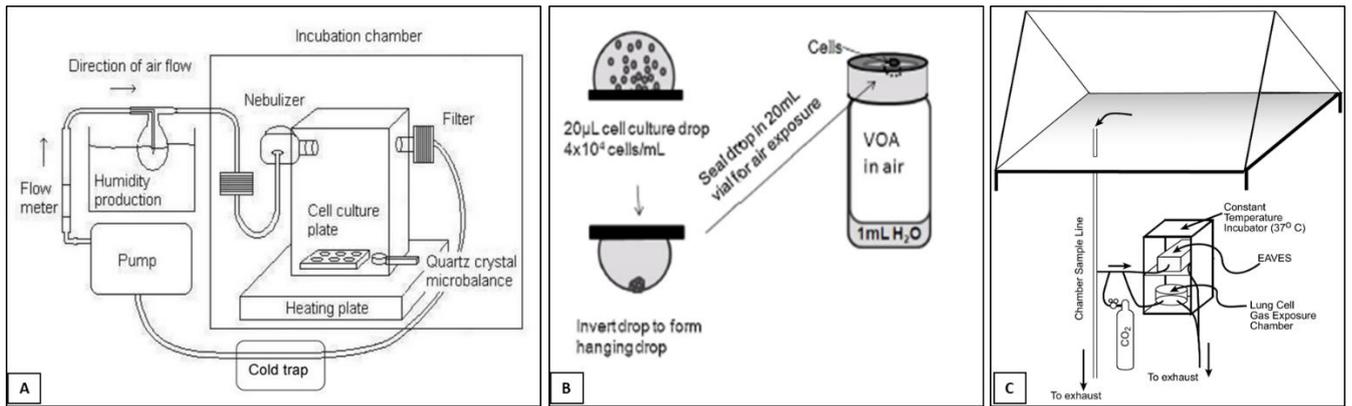


Figure 18 : Dispositifs d'exposition en Interface Air-liquide (A : ALICE; B : Hanging Drop; C : EAVES)

3.3.3 Toxicité cellulaire des COV

Les enquêtes épidémiologiques ont montré qu'une exposition aiguë ou répétée aux COV pouvait être à l'origine de divers symptômes inflammatoires tels que l'asthme ou les rhinites allergiques. Différentes études ont ainsi permis d'émettre l'hypothèse que l'épithélium des voies respiratoires serait un élément important dans la régulation de ces réponses inflammatoires et du remodelage tissulaire (Kooter et al., 2016; Wang et al., 2014). En effet, en plus d'être la première barrière physique entre l'environnement et le milieu interne des poumons, les cellules épithéliales jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire avec la régulation de diverses molécules comme les médiateurs lipidiques, les médiateurs du stress oxydant, les facteurs de croissance ou encore les cytokines. Ces dernières peuvent être anti-inflammatoires, comme par exemple l'interleukine 10 (IL-10) et le Transforming Growth factor-Beta (TGF- β) ou pro-inflammatoires, telles que le Tumor Necrosis Facteur- alpha (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6). Le premier groupe permet la régulation de la réaction inflammatoire grâce à la mise en place de mécanismes de réparation tandis que le deuxième déclenche l'activation des cellules du système immunitaire et modifie la structure des voies respiratoires, occasionnant l'apparition de maladies inflammatoires (Loxham et al., 2014). Ainsi, la régulation de ces deux types de médiateurs par l'organisme permet la régulation des syndromes inflammatoires (figure 19).

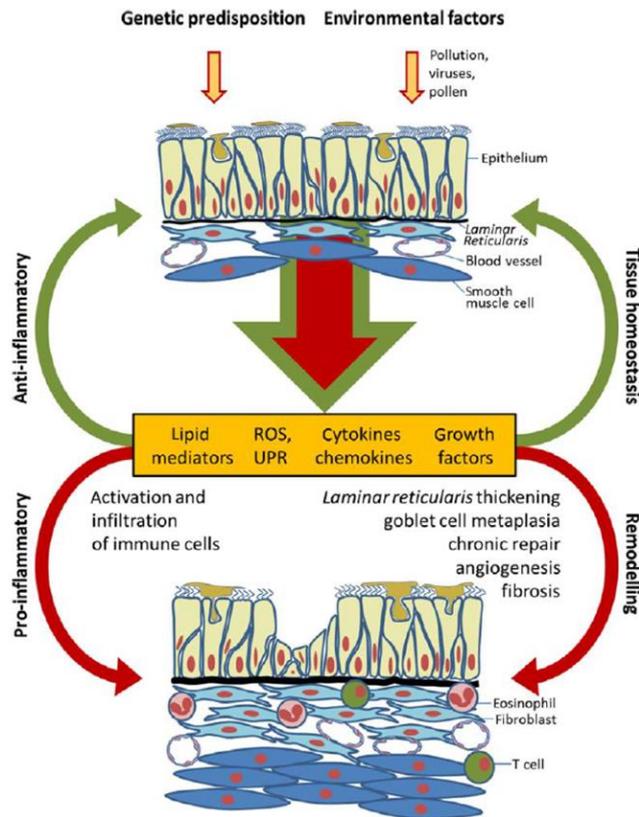


Figure 19 : Rôle de l'épithélium des voies pulmonaires dans la régulation des pathologies inflammatoires (Loxham et al., 2014). ROS : Reactive Oxygen Species ; UPR : Unfolded Protein Response ; T cell : lymphocyte T

Dans les études *in vitro*, l'induction de différentes cytokines pro-inflammatoires est souvent utilisée comme biomarqueur d'effet des hydrocarbures aromatiques. Ces expérimentations sont souvent réalisées en ALI, lors d'expositions aiguës à un ou plusieurs solvants organiques. Ainsi, Gosepath et al. ont évalué l'induction de l'inflammation par la mesure extracellulaire de la prostaglandine E2 (PGE2), dans des cellules primaires nasales humaines exposées à 1, 54 ppm (5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) de benzène (Gosepath et al., 2003). Après 8 h d'exposition au benzène puis 24 h à l'air synthétique en condition statique, les chercheurs ont observé une augmentation significative de la libération de l'hormone PGE2 par rapport aux cellules témoins exposées à l'air synthétique durant 32 h. Dans les études de Pariselli et al., une induction de la sécrétion extracellulaire d'IL-8 par des cellules A549 a également permis de mettre en évidence l'effet inflammatoire d'une exposition aiguë au toluène ou au benzène (Pariselli et al., 2006, 2009a). Toutefois, la réponse pro-inflammatoire des cellules semble dépendante des médiateurs mesurés et des concentrations d'exposition utilisées. Après exposition de cellules A549 pré-stimulées avec du TNF- α à du styrène, du chlorobenzène et du m-xylène seuls ou en mélange, l'induction de 3 cytokines a été mesurée : IL-6, IL-8 et MCP-1 (Fischäder et al., 2008). Ainsi, MCP-1 a été induit lors des expositions aux plus faibles concentrations tandis que IL-8 a été secrétée aux plus fortes concentrations proches des niveaux cytotoxiques. Des mécanismes de synergie ont été observés lors des co-expositions qui ont entraîné une induction à des concentrations environ 100 fois plus faibles.

Des études ont également fait le lien entre l'activation du stress oxydant et l'induction des réponses inflammatoires. Röder-Stolinski et al. ont ainsi étudié l'effet du styrène sur l'induction du marqueur de stress oxydant Glutathion S-Transférase P1 (GSTP1) et de la cytokine pro-inflammatoire MCP-1 associée à l'activation de la voie de signalisation du Facteur Nucléaire-Kappa B (NF-κB) (Röder-Stolinski et al., 2008). Cette voie de signalisation joue un rôle dans les réponses inflammatoires et immunitaires. Ainsi, après exposition des cellules alvéolaires A549 au styrène pour des concentrations comprises entre 23,5 ppb (100 µg/m³) et 235 ppm (1 g/m³), une augmentation dose-dépendante de l'expression de MCP-1 et de GSTP1 a été observée. En revanche, lors de l'inhibition de l'activité de NF-κB par l'antioxydant N-acétylcystéine, il n'y a pas eu de sécrétion du biomarqueur pro-inflammatoire. D'après les auteurs, ces résultats suggèrent que l'apparition de mécanismes de stress oxydant serait responsable de l'initiation de la réponse inflammatoire. Mascelloni et al. ont également exposé des cellules A549 à du benzène (0,03 ; 0,1 et 0,3 ppm) afin d'étudier le pouvoir oxydant et génotoxique de ce dernier (Mascelloni et al., 2015). Après exposition dans une chambre en interface air-liquide, une augmentation des cassures de l'ADN et une augmentation de l'induction d'ERO, toutes deux dépendantes de la concentration d'exposition ont été observées dans les cellules exposées. L'étude de Gospath et al. a confirmé les effets génotoxiques du benzène lors de l'exposition en ALI de cellules épithéliales nasales (Gospath et al., 2003). Après 8 h d'exposition, une augmentation du niveau de fragmentation évalué par le test des comètes a été observée en comparaison aux témoins exposés à l'air.

D'après les résultats obtenus dans les études *in vitro*, l'exposition aux COV aromatiques provoque un dysfonctionnement dans les cellules épithéliales des voies pulmonaires. Les mécanismes toxiques les plus fréquemment retrouvés sont une augmentation du stress oxydant, une apparition d'effets génotoxiques ainsi qu'une induction de la réponse inflammatoire. En parallèle de ces impacts néfastes, des mécanismes de défense face à l'exposition aux polluants atmosphériques peuvent également être étudiés. En effet, les cellules de l'épithélium pulmonaire ont un rôle de barrière chimique contre les agents extérieurs. Les cellules sont capables de produire un mélange protéique riche en mucines, appelé mucus (Loxham et al., 2014). La sécrétion de ce dernier empêche d'une part la déshydratation de l'épithélium et permet d'autre part l'emprisonnement des substances exogènes (virus, particules, composés chimiques) avant leur absorption par les tissus pulmonaires (Fahy and Dickey, 2010).

Actuellement, 21 gènes d'apomucines ou gènes *MUC* ont été recensés (Porchet and Aubert, 2004). Ces derniers sont répartis dans deux familles : les mucines sécrétées, telles que *MUC5AC* ou *MUC5B* ou les mucines épithéliales membranaires, comme par exemple *MUC1*. Parmi les principales mucines sécrétées par les cellules épithéliales, des études ont fait le lien entre l'hypersécrétion de la mucine 5AC (*MUC5AC*) et l'apparition de syndromes inflammatoires, comme l'asthme ou les BPCO (Evans et al., 2009; Voynow et al.,

2006; Wang et al., 2008). Néanmoins lors d'expositions répétées aux xénobiotiques, un dysfonctionnement dans la sécrétion de mucus peut-être observé provoquant ou aggravant l'apparition de maladies chroniques inflammatoires du système pulmonaire (Fahy and Dickey, 2010; Svenningsen et al., 2019). En effet, une hypersécrétion de mucus pourrait potentialiser l'obstruction des voies respiratoires observée chez les sujets asthmatiques. Dans les études *in vitro*, la mesure de l'expression des mucines a été utilisée pour évaluer l'impact des fumées de tabac sur les cellules pulmonaires. Ainsi, l'exposition de cellules épithéliales NCI-H292 ou A549, à de la fumée de tabac a provoqué dans les deux cas une surproduction du gène et de la protéine MUC5AC (Di et al., 2012; Shao et al., 2004). La surexpression des mucines peut également être induite par les composés aldéhydes. En effet, l'exposition répétée de cellules primaires HBEC à des flux gazeux d'acétaldéhyde et d'acroléine, a mis en évidence une augmentation significative de la protéine MUC5AC dans les cellules exposées par rapport aux cellules témoins (Haswell et al., 2010).

Objectifs de la thèse

Les COV aromatiques constituent d'excellents solvants et intermédiaires de synthèse et sont donc largement utilisés dans l'industrie depuis plus d'un siècle. En raison de la nocivité du benzène et de sa substitution, le toluène est maintenant le COV aromatique monocyclique le plus utilisé dans le secteur industriel. Bien que des études chez l'Homme aient montré un gain significatif en termes d'effets sanitaires lors de cette substitution, il convient tout de même de s'intéresser aux mécanismes d'action potentiellement induits par le toluène dans des cellules du système respiratoire. En effet, peu d'études se sont intéressées à l'exposition de cellules de l'épithélium pulmonaire qui constitue pourtant une des principales cibles des polluants. Il existe un manque de connaissances concernant l'effet de ce COV sur les cellules pulmonaires à court et moyen terme. Ce constat est d'autant plus marquant qu'aucune étude *in vitro* ne s'est portée sur l'exposition répétée au toluène alors que des mécanismes prolongés d'irritation sont suspectés en cas d'exposition au vapeur de ce solvant, et que des mécanismes de défense tels que la production de mucus pourraient entrer en jeu. Le premier objectif de la thèse est donc de répondre à la question suivante :

- Quelle est la toxicité aiguë et répétée du toluène sur les cellules épithéliales du système pulmonaire ?

Afin de disposer d'une référence toxique, il est essentiel d'évaluer en parallèle la toxicité du benzène que le toluène a substitué dans certaines de ses applications industrielles. Par ailleurs, dans un intérêt toxicologique d'une part, et dans une optique de substitution éventuelle d'autre part, il semble intéressant de rechercher si les homologues supérieurs du toluène présentent une toxicité moindre ou équivalente à la sienne. La comparaison des résultats entre les différentes expositions devraient aider à comprendre les mécanismes de toxicité, voire à proposer des substituts. Le deuxième objectif de la thèse est donc de répondre à la question suivante :

- Quelle est la toxicité aiguë et répétée de l'homologue inférieur (benzène) et des homologues supérieurs (m-xylène et mésitylène) du toluène sur les cellules épithéliales du système pulmonaire ?

Le toluène et ses homologues aromatiques sont des molécules régulièrement utilisées dans l'industrie dès lors qu'interviennent des manipulations de peintures, vernis et encres. L'inhalation de ces molécules provoque des effets sur le système nerveux et induit des irritations ainsi que des inflammations des voies pulmonaires. Afin de limiter l'exposition de la population aux COV nocifs, il convient de veiller à limiter leurs émissions dans l'atmosphère. S'il n'est pas possible de les substituer par des composés moins toxiques que

ce soit pour des raisons techniques, sanitaires ou économiques, il devient important de mettre en place des méthodes de dépollution à la source. Différents dispositifs d'abattement peuvent être employés, tels que les techniques récupératrices et les méthodes destructrices. Parmi ces dernières, les solutions de post-traitement offertes par les procédés catalytiques présentent un intérêt majeur avec un coût de fonctionnement limité et une sélectivité relativement bonne. Toutefois, dans certaines conditions de fonctionnement, en particulier si le temps de contact des COV avec la surface du catalyseur n'est pas suffisant ou si la température de réaction n'est pas suffisamment élevée, l'élimination des COV peut ne pas être totale et dans ce cas, des sous-produits de réaction peuvent se former. Il convient d'identifier la nature de ces sous-produits et d'en évaluer les effets toxiques potentiels. Dans le cadre de la dégradation par oxydation catalytique du toluène, nous proposons comme troisième objectif de la thèse de répondre à la question suivante :

- Dans quelle mesure la toxicité d'un effluent gazeux est-elle diminuée après post-traitement catalytique ?

Ce travail de thèse s'inscrit dans le Projet Européen Interreg V France-Wallonie-Vlaanderen « DepollutAir », en collaboration avec les équipes « Traitement Catalytique et Energie Propre » (TCEP) de l'UCEIV, porteuse du Projet, et le Centre Commun de Mesures (CCM) de l'ULCO.

Afin de répondre aux trois objectifs de la thèse énoncés précédemment, une stratégie expérimentale a été élaborée en deux parties (figure 20). La première partie traite de la réponse des cellules exposées aux effluents de COV étudiés individuellement sans traitement catalytique. Dans un premier temps, la toxicité du toluène sera étudiée en exposant *in vitro* en ALI des cellules pulmonaires humaines de manière aiguë et répétée aux effluents reconstitués non traités. Dans un deuxième temps, l'effet d'expositions aiguës ou répétées de cellules exposées au benzène, au xylène et au mésitylène sera étudié. La deuxième partie du projet de thèse est consacrée à l'étude toxicologique des émissions issues de l'oxydation catalytique du toluène, en collaboration avec l'équipe TCEP qui a étudié les propriétés de deux catalyseurs performants dans l'oxydation totale du toluène.

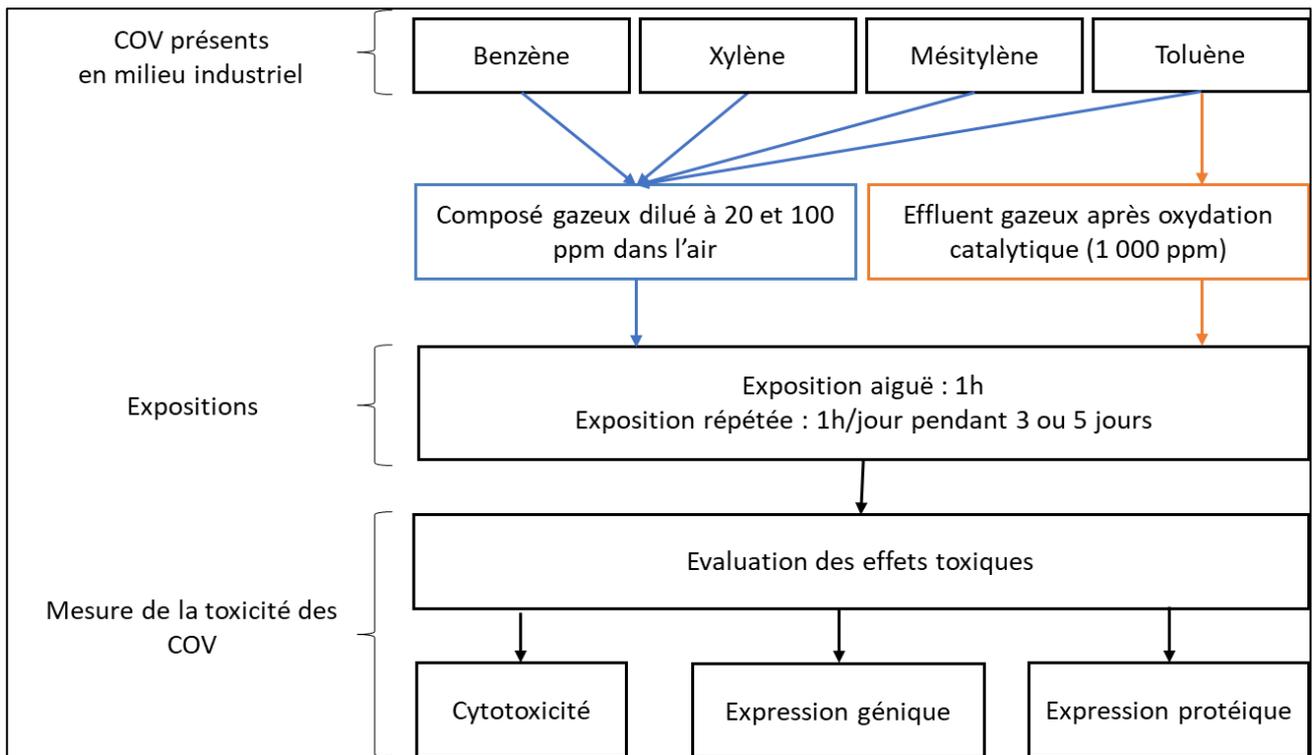


Figure 20 : Stratégie expérimentale adoptée dans le cadre de la thèse

Pour répondre à la problématique, nous avons choisi de travailler avec les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B. Afin de suivre une cinétique des mécanismes d'action des composés testés, nous avons effectué 3 séries d'expositions de durée différente, en présence de chacun des polluants : une exposition unique de 1 h représentant une exposition aiguë, une exposition de 1 h par jour pendant 3 jours et une exposition de 1 h par jour pendant 5 jours, ces deux dernières correspondant à des expositions répétées. L'évaluation des mécanismes d'action a été ensuite réalisée grâce au suivi de plusieurs marqueurs toxicologiques recherchés à la fin de chacune des 3 séries d'exposition. Les paramètres toxicologiques mesurés concernent la cytotoxicité, l'évaluation de la morphologie des cellules, l'activation de la transcription des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, l'expression génique et la sécrétion de cytokines de l'inflammation, ainsi que l'expression génique de mucines.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1 Oxydation catalytique du toluène

1.1 Les catalyseurs

L'oxydation totale du toluène a été réalisée en utilisant deux catalyseurs solides : un catalyseur commercial de référence Pd/ γ -Al₂O₃ (Acros Organics, 0,5 % de Pd) et un catalyseur de type oxyde mixte présentant une structure spinel Co₆Al₂-O. Comme décrit par Genty et al., ce dernier a été synthétisé par une méthode de coprécipitation en utilisant des sels métalliques avec un rapport molaire Co/Al de 6/2 (Genty et al., 2015). Le premier catalyseur correspond à un matériau à base de métal noble (le palladium) et qui peut être considéré comme un catalyseur de référence en oxydation de composés organiques volatils. Le second matériau, synthétisé par l'équipe TCEP du laboratoire UCEIV contient une phase active à base de cobalt qui se retrouve au sein de structures spinelle CoAl₂O₄ et Co₂AlO₄. Le recours aux oxydes de métaux de transition comme l'oxyde de cobalt est aujourd'hui considéré comme une alternative à l'utilisation des métaux nobles, dont le coût est beaucoup plus élevé que celui des oxydes de métaux de transition.

Différentes caractéristiques des catalyseurs, comme la surface spécifique S_{BET} , permettent de caractériser et de tester les catalyseurs. La mesure de ces paramètres, abordée dans les parties suivantes, a été effectuée par l'équipe TCEP de l'UCEIV. Les résultats obtenus sont recensés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Comparaison des paramètres catalytiques de Pd/ γ -Al₂O₃ et Co₆Al₂-O aux concentrations d'oxydation totale de toluène (T_{50} : Température à laquelle 50 % de toluène est converti ; T_{100} : Température à laquelle 100 % de toluène est converti ; T_{exp} : Température expérimentale de réaction catalytique utilisée lors de l'exposition des cellules aux effluents, S_{BET} : surface spécifique)

Catalyseurs	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	T_{50} (°C)	T_{100} (°C)	T_{exp} (°C)
Pd/ γ -Al ₂ O ₃	252	179	212	260
Co ₆ Al ₂ -O	123	280	292	350

1.2 Caractérisation des catalyseurs Pd/ γ -Al₂O₃ et Co₆Al₂-O

La surface spécifique (S_{BET}) correspond à la superficie d'un matériau accessible aux molécules gazeuses. Ainsi plus l'aire spécifique d'un échantillon sera élevée, plus la capacité d'adsorption de composés gazeux sur la surface du solide sera élevée. Les surfaces spécifiques des deux catalyseurs ont été mesurées par la méthode de Brunauer-Emmet-Teller, à l'aide d'un dispositif « ThermoElectron Qsurf series Surface Area Analyzer ». Après calcination des catalyseurs pendant 1 h sous un flux d'hélium, une phase d'adsorption a

été réalisée à -196°C avec un mélange de N₂/He (30/70). Dans un deuxième temps, la désorption de l'azote gazeux a été quantifiée avec un détecteur de conductivité thermique. Ainsi, les valeurs de S_{BET} obtenues pour les catalyseurs Pd/γAl₂O₃ et Co₆Al₂-O sont respectivement de 252 et 123 m².g⁻¹.

1.3 Tests catalytiques

L'efficacité des catalyseurs à convertir le toluène a été évaluée dans un réacteur à lit fixe. Une concentration de 1 000 ppm de toluène a été générée dans un flux d'air à un débit de 100 mL.min⁻¹. Les expérimentations ont été effectuées à des températures comprises entre la température ambiante et 250°C pour Pd/γAl₂O₃ ou 350°C pour Co₆Al₂-O. Les tests catalytiques ont ensuite été suivis dans des conditions isothermes pendant 5 jours. La composition du flux gazeux après réaction catalytique a été analysée avec une micro chromatographie en phase gazeuse (Varian CP-4900).

Ces tests catalytiques ont permis de calculer le taux de conversion du toluène selon la formule suivante :

$$X_T = \frac{[CO_2]_T + [CO]_T + [C_6H_6]_T \times 6}{[CO_2]_T + [CO]_T + [C_6H_6]_T \times 6 + [C_7H_8]_T \times 7} \times 100$$

En prenant :

- X_T (%) : conversion du toluène à la température T
- [I]_T (ppm) : concentration du composé I à la température T

Cette information a également été utilisée pour tracer les courbes dites de light-off des deux catalyseurs (figure 21). Ces courbes représentent le pourcentage de conversion du toluène en fonction de la température au niveau du catalyseur et permettent de définir les conditions optimales de fonctionnement des 2 catalyseurs. Les performances catalytiques des deux catalyseurs ont ainsi été comparées à T₅₀ et T₁₀₀, représentant respectivement les températures auxquelles 50 % et 100 % du toluène a été converti (figure 21) lors des tests effectués en montée progressive de température. Ainsi pour le catalyseur commercial (Pd/γAl₂O₃, courbe rouge), la température minimale pour obtenir 100 % de conversion (T₁₀₀) est de 212°C tandis que pour le catalyseur Co₆Al₂-O (courbe bleue), elle est de 292°C. Toutefois, pour réaliser les expériences de validation toxicologique, des températures de réaction catalytique (T_{exp}) supérieures à la valeur de T₁₀₀ ont été retenues, de manière à ce que la formation de sous-produits (par exemple le benzène) résultant de la conversion du toluène soit la plus faible possible, voire inexistante (Brunet et al., 2015). Ainsi des valeurs de T_{exp} de 260°C pour Pd/γAl₂O₃ et 350°C pour Co₆Al₂-O, pour les tests effectués en condition isotherme pendant 5 jours.

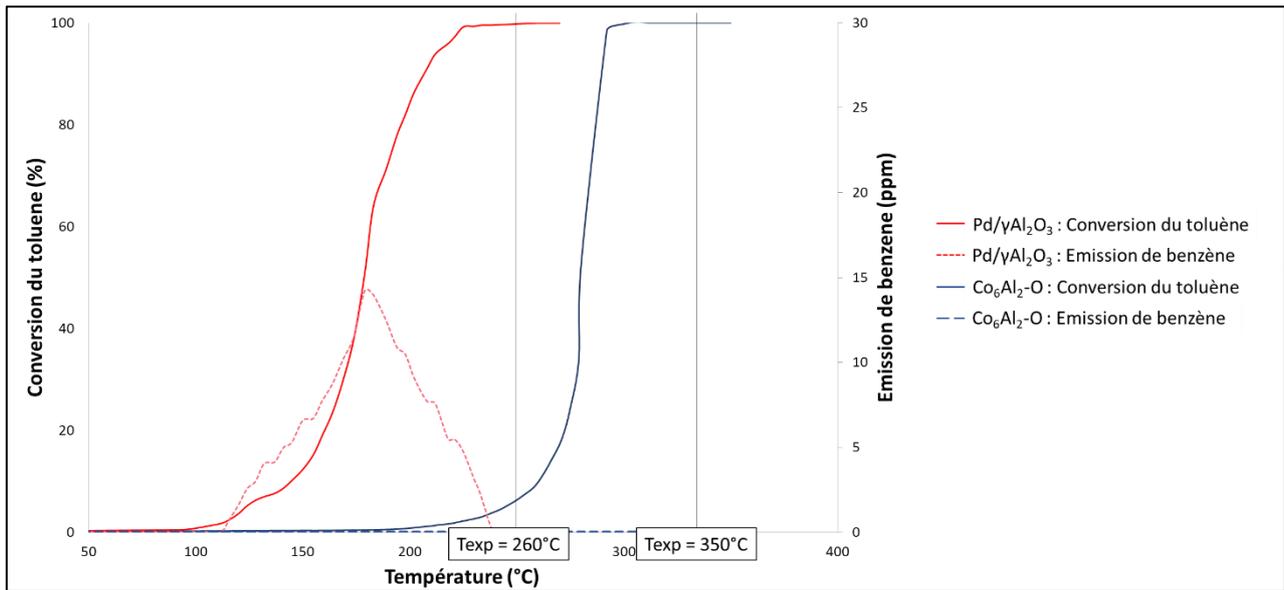


Figure 21 : Courbes de conversion catalytique du toluène en fonction de la température mesurée au niveau du catalyseur utilisé : Pd/γAl₂O₃ ou Co₆Al₂O (concentration d'entrée du toluène : 1 000 ppm). La quantité de benzène émise suivant la température de réaction en présence de chaque catalyseur est représentée en pointillés.

2. Exposition des cellules BEAS-2B en Interface Air-liquide

Afin d'étudier les impacts du toluène, de ses homologues ainsi que des effluents gazeux issus de son oxydation catalytique, un dispositif expérimental a été mis en place. Ce dernier est schématisé sur la figure 22 et présenté dans les paragraphes suivants.

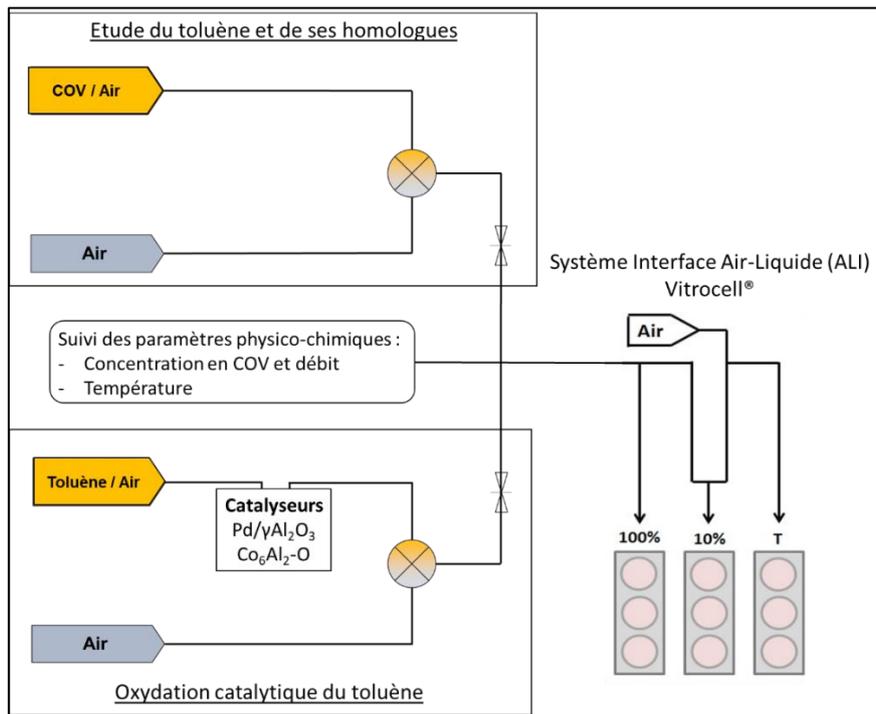


Figure 22 : Dispositif expérimental du système d'exposition des cellules en interface air-liquide au toluène, à ses homologues et aux effluents gazeux issus de son oxydation catalytique

2.1 Génération dynamique des flux de COV gazeux

Le flux de COV à 100 ppm ou 1 000 ppm (dilué dans l'air filtré) a été produit de manière dynamique, en utilisant un générateur de mélanges gazeux (Bronkhorst France). Cet équipement a été placé en amont du système ALI, permettant ainsi d'exposer directement les cellules BEAS-2B à un flux continu du mélange air et polluant. Lors de l'étude des effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène, le réacteur contenant le catalyseur a été installé entre le générateur de COV et le système d'exposition. La température des mélanges gazeux a été contrôlée en amont du système d'exposition des cellules. La température en sortie de l'enceinte du générateur de COV et celle des effluents issus de l'oxydation catalytique du toluène étaient respectivement égales à 37°C et à 39 °C.

La figure 23 représente les différents éléments composant le générateur de mélanges gazeux. Les COV sont initialement introduits à l'état liquide dans une ampoule servant de réservoir. Grâce à un premier débitmètre à effet Coriolis, les COV sont injectés dans un circuit thermostaté à 42°C où se produit leur volatilisation, dans un flux d'air contrôlé par un débitmètre massique, avec une précision de l'ordre de 0,1 %. La régulation du débit permet d'ajuster la concentration en COV à une valeur souhaitée au sein du mélange gazeux. En sortie du générateur, deux étages de dilution peuvent être utilisés en fonction de la concentration en COV choisie pour l'exposition cellulaire. Le flux du premier étage correspond à la concentration de COV la plus élevée. Ce mélange peut subir une seconde dilution à l'air filtré pour obtenir des concentrations plus faibles (de l'ordre de 10 à 100 ppm) en sortie de deuxième étage.

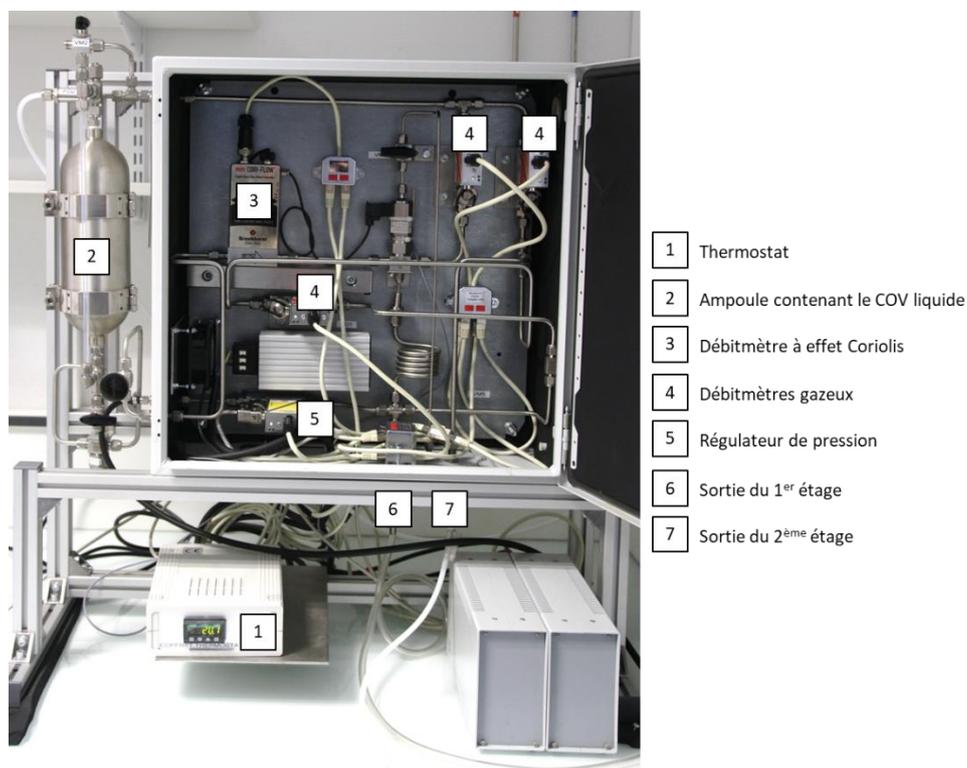


Figure 23 : Générateur de mélanges de COV

3. Débitmètre massique pour composés liquides à effet Coriolis /4. Débitmètres massiques pour composés gazeux

2.2 Le système d'exposition en Interface Air-liquide

Les cellules BEAS-2B ont été exposées aux flux gazeux du benzène, du toluène, du m-xylène ou du mésitylène (pureté > 99,9 %, VWR Chemicals) dilués dans l'air ou aux flux gazeux résultant de l'oxydation catalytique du toluène, à l'aide du système d'exposition en Interface Air-Liquide de type Vitrocell® (Vitrocell GmbH, Allemagne). Le dispositif utilisé dans notre projet (figure 24) est composé de trois modules 6/3 CF Stainless : un pour les expositions à l'air filtré, et deux pour les expositions aux flux gazeux post-oxydation catalytique ou chargés en COV. Les modules sont divisés en deux parties : la base est équipée de trois puits pouvant contenir 17,5 mL de milieu de culture et les inserts tandis que la partie supérieure, constituée de trois trompettes, délivre le composé gazeux au niveau de la partie apicale des cellules. Avant chaque expérimentation, le surnageant supérieur a été retiré de chaque insert Transwell®, conservé à 37°C pendant l'heure d'exposition. Les cultures cellulaires exposées ont été remises en condition immergée en utilisant le milieu d'origine et placées à l'incubateur. Afin de maintenir les inserts de culture cellulaire à une température de 37°C, l'ensemble du dispositif est thermostaté à l'aide d'un circuit d'eau chauffé par bain-marie. Un étage de dilution a été ajouté au niveau de l'un des deux modules pour obtenir les plus faibles concentrations d'exposition, c'est-à-dire 20 ou 100 ppm lorsque la concentration en sortie de générateur est respectivement de 100 ou 1 000 ppm. Ainsi, les flux gazeux sont aspirés à travers les modules et entrent ensuite en contact avec les cellules cultivées sur les inserts placés dans les puits des modules. En effet, une pompe à vide, installée en sortie de système d'exposition aspire ces flux à un débit de 5 mL.min⁻¹ au niveau de chaque puits.

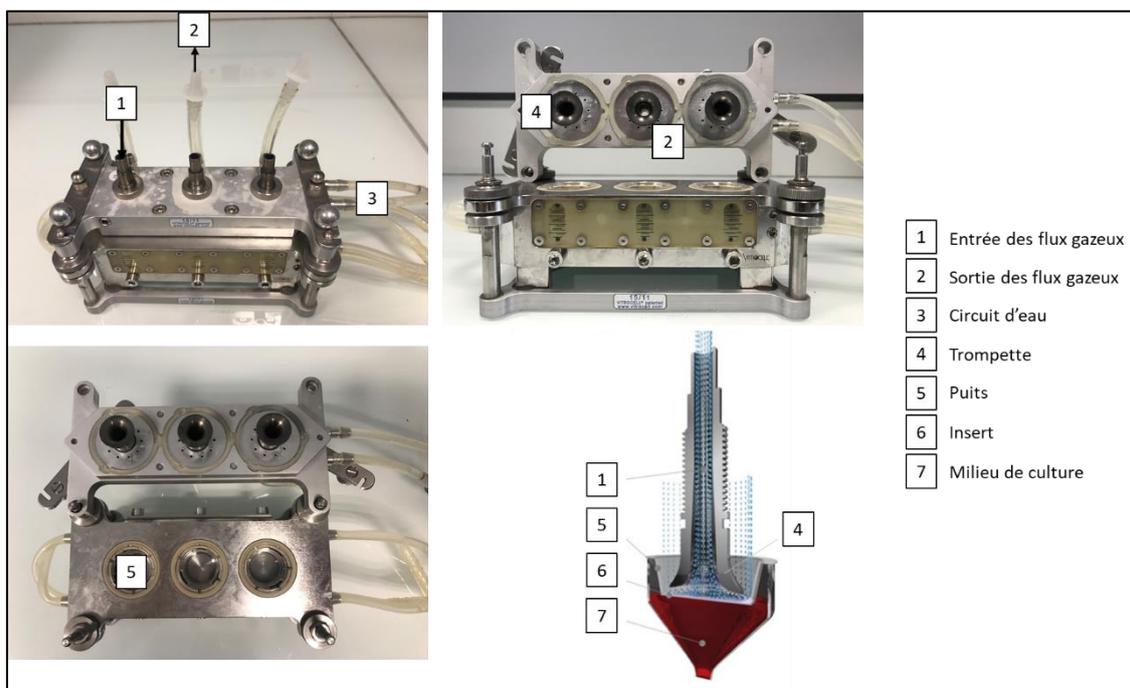


Figure 24 : Module Vitrocell et illustration de l'exposition de cellules en interface air/liquide (<https://www.vitrocell.com>)

Deux concentrations différentes ont été générées lors de l'exposition des cellules aux quatre COV : (i) 100 ppm du COV correspondant à la Valeur Limite à Court Terme (VLCT) et (ii) 20 ppm du COV dilué dans l'air représentant la Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) du toluène. Pour l'évaluation des effluents gazeux avant et après traitement catalytique, quatre mélanges de gaz ont été testés : (i) 1 000 ppm et (ii) 100 ppm de toluène dilué dans l'air, (iii) 100 % et (iv) 10 % du débit gazeux après traitement catalytique. Parallèlement, des cellules ont été exposées à l'air purifié ou ont été conservées dans l'incubateur afin de servir de contrôles négatifs.

En vue d'étudier les effets d'une exposition répétée, les cellules ont été exposées aux différentes conditions chaque jour pendant 1 heure sur une période de 5 jours consécutifs, puis récoltées les jours 1, 3 ou 5. Cinq heures après l'exposition des cellules aux différents flux gazeux, les surnageants ont été recueillis tandis que les inserts Transwell® ont été rincés avec du Phosphate Buffer Saline (PBS) avant d'être conservés à -80°C.

2.3 Analyses chimiques

2.3.1 Métrologie des flux gazeux produits par le générateur de COV

La concentration en hydrocarbures aromatiques émis par le générateur a été mesurée par μ GC (GC Agilent Technologies 5975C). La quantification a été réalisée grâce à l'injection d'échantillons standards calibrés de chaque COV. L'analyse des flux gazeux a été effectuée avant les expérimentations puis toutes les 5 minutes durant les expositions cellulaires afin d'avoir un suivi en continu de la concentration d'exposition.

2.3.2 Analyse chimique des effluents d'oxydation catalytique des catalyseurs testés

Afin de mettre en évidence la présence éventuelle de toluène non-converti ainsi que la formation potentielle de sous-produits, les flux gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène ont été prélevés en utilisant des cartouches d'adsorption Tenax™ (Perkin Elmer). Les composés retenus sur ces cartouches ont été désorbés à l'aide d'un désorbeur thermique (TurboMatrix, Perkin Elmer). Brièvement, une première désorption à 250°C pendant 10 minutes est réalisée puis les molécules désorbées ont été reconcentrées sur un piège refroidi à -25°C. Puis une 2^{ème} désorption, dite flash, a été réalisée à la suite d'une augmentation rapide de la température à raison de 40°C par seconde jusqu'à un palier de 220°C. Les composés ont été ensuite analysés et quantifiés par GC/MS (Perkin Elmer GC Clarus 680/MS Clarus 600S) puis identifiés à partir de la base de données NIST. Le tableau 9 résume la méthode de GC/MS utilisée. Les prélèvements ont été effectués à la fin des expositions à J1, J3 et J5 pendant 15 minutes pour un débit de 5 mL.min⁻¹ de l'effluent gazeux.

Tableau 9 : Méthode chromatographique utilisée pour l'analyse et la quantification par GC/MS des composés piégés sur cartouche d'adsorption Tenax™

Paramètres expérimentaux	Valeurs
Durée de l'analyse	47 minutes
Colonne	Elite 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Source	EI +
Masses mesurées	40 à 300 unités de masse
Température de la ligne de transfert	200°C
Réglages du four de GC	40°C pendant 1 min
	40-200°C (+ 5°C/min)
	200°C pendant 10 min

3. Modèle cellulaire

3.1 Les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B

Les cellules BEAS-2B proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) sous la référence ATCC® CRL-9609™. Ce sont des cellules épithéliales bronchiques humaines, l'une des premières cibles des polluants atmosphériques, isolées lors de l'autopsie d'un donneur sain (figure 25) puis transformées par un adénovirus hybride 12-SV40 et clonées. Grâce à son immortalisation, cette lignée cellulaire a la capacité de se multiplier indéfiniment sans aucune modification phénotypique, ce qui permet de réaliser des expositions subaiguës (Zhou et al., 2016). Elle est métaboliquement active (Uppstad et al., 2010) et capable de sécréter des cytokines (BéruBé et al., 2009). De plus, elle s'est également révélée apte à la culture sur insert et à l'exposition en interface air-liquide (Hiemstra et al., 2018; Vales et al., 2015).

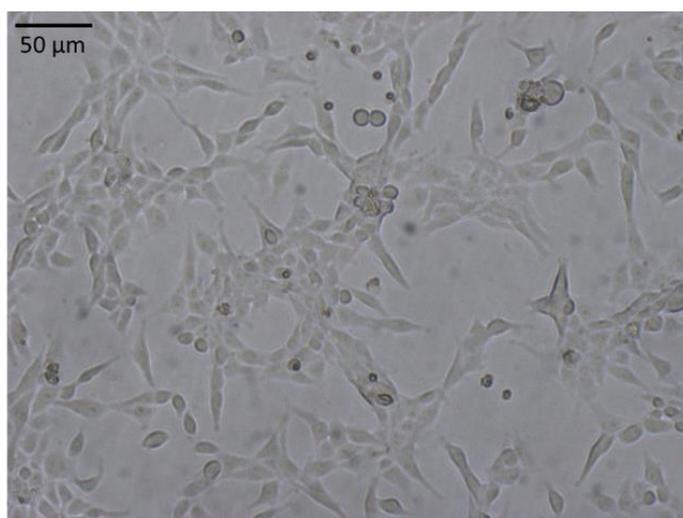


Figure 25 : Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B

3.2 Conditions de culture cellulaire

3.2.1 Optimisation des conditions de culture cellulaire

Un travail d'optimisation a permis de valider les conditions de culture et d'exposition des cellules BEAS-2B. Le premier objectif était de trouver la concentration optimale d'ensemencement permettant d'exposer les cellules le plus longtemps possible, afin de réaliser des expositions répétées. Deux critères d'évaluation ont été utilisés : l'absence de modification de la morphologie et du développement des cellules. La confluence des cellules a également été limitée à 80 %. Six concentrations d'ensemencement ont été testées, dans des plaques 6 puits CellBind® (Corning) : 190, 375, 750, 1 500, 3 000 et 6 000 cellules.cm⁻². Une observation microscopique a été réalisée quotidiennement pendant 14 jours.

Les conditions d'exposition avec le système Vitrocell® ont également été optimisées. Pour cela, nous avons déterminé le nombre de jours maximum pendant lequel il est possible de réaliser l'exposition des cellules BEAS-2B avec le système ALI. Les cellules ont étéensemencées sur des inserts Corning® Transwell® de 4,7 cm² possédant des pores d'un diamètre de 0,4 µm et exposées à l'air filtré, 1 heure/jour pendant 8 jours consécutifs. La cytotoxicité et la prolifération ont été évaluées en prenant comme contrôle les cellules non exposées placées dans des inserts similaires à l'intérieur de l'incubateur à 37°C.

3.2.2 Protocole de culture cellulaire

Pour une croissance optimale et pour éviter une différenciation des cellules BEAS-2B, la culture de ces dernières nécessite des conditions spécifiques :

- Les contenants de culture doivent-être prétraités afin de permettre une adhésion optimale de la lignée cellulaire.
- L'utilisation d'un milieu de croissance sans sérum, de type LHC-9 ou BEGM est nécessaire.
- Enfin, la confluence des cellules ne doit pas être supérieure à 80 % comme recommandée par l'ATCC.

En accord avec ces recommandations, les cellules BEAS-2B ont été cultivées à partir d'une même ampoule dans des flacons stériles Corning® Cellbind® avec un milieu de culture LHC-9 (Gibco, ThermoFisher Scientific) puis incubées à 37°C dans un environnement contenant 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité. Environ 24 h avant le début des expositions, les cellules ont été décollées avec une solution de trypsine 0,25 % puis ont étéensemencées dans des inserts de culture de type Transwell®. Trois concentrations cellulaires différentes ont été utilisées pour les expositions à 1, 3 et 5 jours. Ces 3 concentrations ont été choisies afin d'obtenir un nombre final de cellules identique à la fin des 3 temps d'exposition, soit 500 000 cellules/insert. Les BEAS-2B ont ensuite été incubées avec 1 mL de milieu de culture au niveau de la partie basale et 1 mL au niveau de la partie apicale.

3.4. Evaluation toxicologique

3.4.1 Microscopie

Au terme des expérimentations d'optimisation, l'effet de la culture des cellules et de leur exposition répétée à l'air filtré et au toluène (100 et 1 000 ppm) en ALI a été testé. Différents paramètres morphologiques ont ainsi été évaluées par observation microscopique, comme par exemple la longueur et le volume des cellules, leur forme ou encore leur granulosité. Après exposition des cellules au toluène pendant 1 heure chaque jour pendant 1, 3 ou 5 jours, les inserts ont été fixés au formaldéhyde (solution à 2 % dans du PBS) pendant 30 minutes. La coloration des cellules BEAS-2B a été effectuée selon le protocole décrit par Feldman et Wolfe (Feldman and Wolfe, 2014). Cette méthode associe deux réactifs : l'hématoxyline de Harris pour une coloration des noyaux en violet tandis que l'éosine permet la coloration des cytoplasmes en rose. Deux bains dans l'alcool absolu ont rendu l'insert hydrophobe pour le collage et le montage sous lamelle à l'aide de résine de montage Eukitt®. Pour finir, les inserts témoins ou exposés au toluène ont été visualisés avec un microscope photonique (Zeiss AxioScope) au grossissement X100.

3.4.2 Evaluation de la viabilité cellulaire

Le kit Cytotoxicity Detection LDH (Roche Diagnostic, Merck-Millipore) a été utilisé pour évaluer la cytotoxicité. Cette méthode colorimétrique permet d'évaluer l'intégrité de la membrane cellulaire grâce à la quantification extracellulaire de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Naturellement présente dans le cytosol des cellules, la LDH permet la conversion du pyruvate ($\text{CH}_3\text{-CO-COO}^-$) en lactate ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$), tout en réduisant les protons NAD^+ en NADH,H^+ (figure 26). Lorsque les cellules sont mortes ou que leur membrane plasmique est endommagée, l'enzyme LDH est libérée dans le milieu de culture. Celle-ci réagit ensuite avec le sel de tétrazolium du kit (couleur jaune) pour former du formazan (couleur rouge). Ainsi, la concentration en formazan est proportionnelle au nombre de cellules endommagées.

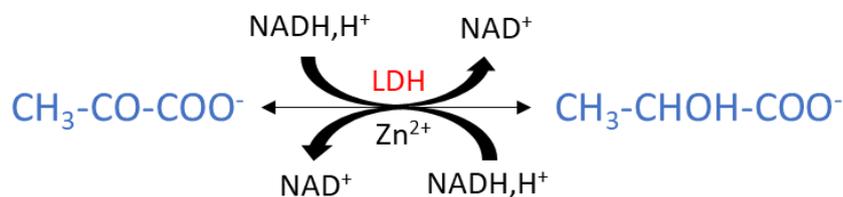


Figure 26 : Conversion du pyruvate en lactate par l'enzyme Lactate Déshydrogénase (LDH)

La mesure de la LDH extracellulaire a été réalisée dans les surnageants des cellules exposées aux polluants ou à l'air filtré durant 1, 3 ou 5 jours. Cinq heures après la fin des expositions, 100 μL de surnageant de chaque insert ont été transférés en triplicat dans une plaque 96 puits. En parallèle, des cellules cultivées dans les mêmes conditions ont été exposées pendant 30 minutes à une solution de Triton X-100 à 2 % (v/v)

dans le milieu de culture, afin d'être utilisées comme contrôle positif (100 % de cytotoxicité) et 100 µL du surnageant ont été transférés dans la plaque 96 puits également. Puis, 100 µL du réactif de détection de la LDH contenant le formazan ont été ajoutés dans chacun des puits. La plaque a ensuite été incubée pendant 30 min, à température ambiante et dans le noir, avant mesure de la densité optique à 490 nm et 600 nm avec un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo Fisher Scientific). Pour chacune des conditions testées, le pourcentage de cytotoxicité a été calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{témoin air}}}{Abs_{\text{triton X-100}} - Abs_{\text{témoin air}}} \times 100$$

Un suivi de la stabilité de la lactate déshydrogénase dans le temps et en présence des COV étudiés a également été réalisé. Pour effectuer ce test, un standard de LDH a été mis en contact pendant 5 jours à 37°C avec chacune des molécules à une concentration de 100 ppm. Une solution composée uniquement de milieu de culture et de standard de LDH a été utilisée comme contrôle positif. Des volumes de 100 µL de chaque condition ont été prélevés de J1 à J5 puis transférés dans une plaque 96 puits. La quantification de la LDH, selon le protocole décrit précédemment, n'a montré aucun changement significatif comparé au contrôle positif. Il n'y a donc pas d'altération de la LDH liée à la présence des différents COV testés dans nos conditions expérimentales.

3.4.3 Mesure de la prolifération cellulaire

Le test AlamarBlue™ (Invitrogen, ThermoFisher Scientifique) a été utilisé pour l'optimisation des conditions d'exposition des cellules BEAS-2B avec le système Vitrocell®. Cette méthode mesure l'activité mitochondriale des cellules et permet ainsi d'évaluer la prolifération cellulaire. Elle est basée sur la capacité des cellules vivantes à convertir la résazurine, molécule bleue et peu fluorescente, en résorufine, composé fluorescent de couleur rose (figure 27). La concentration en résorufine métabolisée est donc proportionnelle au nombre de cellules fonctionnelles.

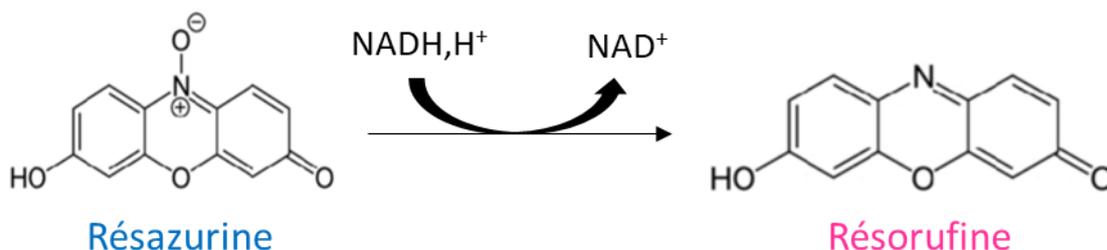


Figure 27 : Conversion de la résazurine en résorufine

Le suivi de la prolifération cellulaire a été effectué chaque jour entre le 1^{er} et le 8^{ème} jour d'exposition des cellules BEAS-2B à l'air filtré. Ainsi, 200 µL de la solution réactionnelle fournie par le kit ont été ajoutés dans les inserts exposés et témoin directement après la fin des expositions. Après 4 h d'incubation à 37°C et à l'obscurité, 100 µL du mélange surnageant-résorufine ont été transférés dans une plaque 96 puits noire. Puis, l'intensité de la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm avec un fluorimètre Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems). Les résultats sont exprimés en index de prolifération relative et correspondent au ratio de l'intensité de fluorescence des cellules exposées à l'air filtré sur les cellules témoins laissées dans l'incubateur. Une valeur inférieure à 1 signifie donc que la prolifération cellulaire chez les cellules exposées est plus faible que chez les cellules témoins non exposées.

3.4.4 Extraction de l'ADN, de l'ARN et des protéines

Deux kits utilisant la méthode par colonne d'affinité (Le kit SurePrep™ de Fisher BioReagents et le kit Nucleospin® TriPrep de Macherey-Nagel) ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN, de l'ARN et des protéines des cellules témoins et des cellules exposées. Cette méthode comprend plusieurs phases de purification et d'élution du matériel cellulaire. Après décongélation des inserts Transwell®, les cellules BEAS-2B ont été lysées puis transférées dans un microtube avec de l'éthanol 95 %. Le mélange a ensuite été transféré sur une colonne fournie dans le kit et une première centrifugation a permis de lier l'ADN et l'ARN à la colonne tandis que les protéines ont été éluées dans le microtube. Les étapes suivantes correspondent au lavage et à l'élution de l'ARN grâce à une solution sélective qui maintient les liaisons entre l'ADN et la colonne et élue l'ARN. De nouvelles phases de lavage et d'élution ont été réalisées avec un tampon d'élution spécifique afin de collecter l'ADN. Puis les protéines, stockées dans la glace pendant les étapes précédentes, ont été transférées sur la colonne, préalablement activée pour permettre la liaison avec les protéines. Après une étape de lavage, les protéines ont également été éluées dans un microtube contenant une solution de neutralisation des protéines. Pour finir, l'ARN et l'ADN ont été stockés à la température de -20°C tandis que les protéines ont été conservées à -80°C.

3.4.5 Evaluation de l'expression génique

Après extraction, l'ARN a été quantifié par spectrophotométrie à 260 nm en utilisant une µdrop™ plate (ThermoFisher). Un contrôle de la qualité de l'ARN a également été réalisé en utilisant un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies) et des puces *Agilent RNA 6000 Nano Chips*, par fluorescence après séparation des composants par électrophorèse capillaire. Ainsi, les échantillons ayant obtenu un RNA Integrity Number (RIN) supérieur à 8 ont été conservés pour l'évaluation de l'expression génique.

Le niveau d'expression des gènes dans les cellules BEAS-2B a été évalué par la technique RT-qPCR (Reverse Transcription-real time quantitative Polymerase Chain Reaction). L'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total pour un volume final de 45 µL en utilisant le *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystem, ThermoScientific), en se conformant au protocole du fabricant. La transcription inverse (RT) a été réalisée avec le thermocycleur SimpliAmp (Applied Biosystems) selon les étapes suivantes : hybridation des Random Primer, transcription inverse de l'ARNm en ADNc, inactivation de l'enzyme puis refroidissement de la RT jusqu'à conservation des échantillons à 4°C. Les temps et températures associés à chacune des étapes sont donnés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Programme de température de la transcription inverse

	Hybridation	Rétrotranscription	Inactivation	Conservation
Température	25°C	37°C	85°C	4°C
Durée	10 min	120 min	5 min	

L'expression de 19 gènes a été quantifiée à l'aide du kit TaqMan® Advanced Master Mix et des amorces TaqMan® Assay (tableau 11). Pour chaque échantillon analysé en duplicat, 10 ng d'ADNc ont été utilisés pour un volume final de 10 µL. La réaction de PCR a été effectuée en utilisant le thermocycleur Quant Studio 3 (Applied Biosystems). Le programme « one step » utilisé comprenait une succession de 40 cycles divisés en 3 périodes : la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 20 s, puis l'hybridation des amorces et de la sonde à 60°C et enfin l'élongation permettant la libération du fluorophore effectué à 72°C pendant l'augmentation de la température entre 60°C et 95°C.

Tableau 11 : Sondes TaqMan utilisées pour la qPCR

Gène	Référence amorce	Gène	Référence amorce
<i>18S</i>	Hs99999901_s1	<i>EPHX1</i>	Hs01116806_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1	<i>NQO1</i>	Hs02512143_s1
<i>B2M</i>	Hs00187842_m1	<i>GSTM1</i>	Hs01683722_g1
<i>HPRT</i>	Hs02800695_m1	<i>DHDH</i>	Hs00205528_m1
<i>UBC</i>	Hs01871556_s1	<i>ADH1A</i>	Hs00605167_g1
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	<i>ALDH2</i>	Hs01007998_s1
<i>CYP1A1</i>	Hs01054797_g1	<i>ALDH3B1</i>	Hs00997594_m1
<i>CYP1B1</i>	Hs00164383_m1	<i>IL-6</i>	Hs00174131_m1
<i>CYP2E1</i>	Hs00559368_m1	<i>IL-8</i>	Hs00174103_m1
<i>CYP2S1</i>	Hs00258076_m1	<i>MUC1</i>	Hs00159357_m1
<i>CYP2F1</i>	Hs00167949_m1	<i>MUC5AC</i>	Hs01365616_m1

Les résultats obtenus par le logiciel « Quant Studio™ Design and Analysis » sont donnés sous forme de C_t (Cycle Threshold) ou C_q (Cycle de Quantification), correspondant au nombre de cycles d'amplification pour lequel l'intensité de fluorescence est significativement supérieure au bruit de fond. Ces valeurs de C_t ont été analysées par la méthode du $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008) en utilisant des cellules exposées à l'air comme référence.

La normalisation du niveau d'expression des gènes d'intérêt a été réalisée grâce à la moyenne géométrique des C_t de trois gènes de référence : ARN ribosomal 18S (*18S*), Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*GAPDH*) et Bêta-2 microglobuline (*B2M*), après recherche des gènes les plus stables parmi six gènes (*18S*, *GAPDH*, *B2M*, *HPRT*, *UBC* et *ACTB*) fréquemment décrits et utilisés comme référence (Vandesompele et al., 2002). Les valeurs de C_t obtenues pour toutes les modalités de l'étude sont données dans la figure 28 et les gènes retenus sont ceux ayant le moins de variation.

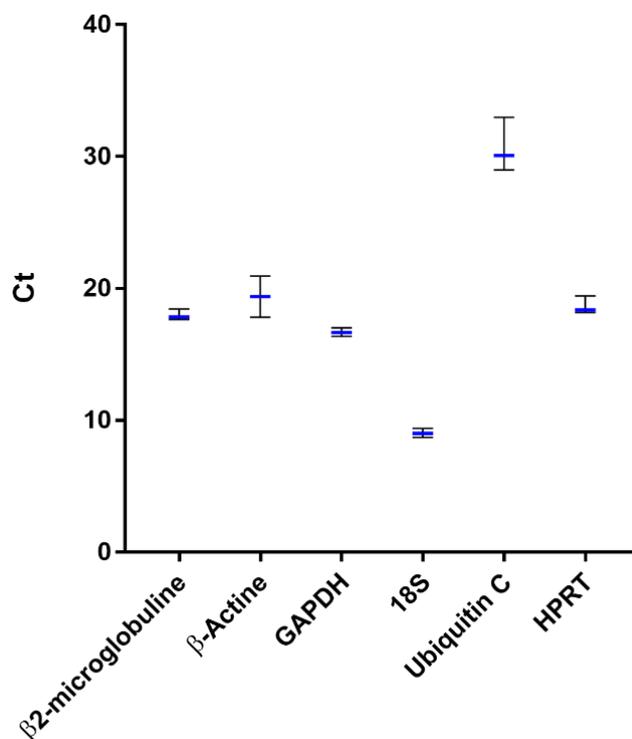


Figure 28 : Nombre de cycles pour atteindre le seuil de fluorescence : C_t médian (en bleu) et C_t minimum et maximum (en noir) obtenus après amplification de 10 ng d'ARN provenant de chacune des modalités de l'étude (témoin, cellules exposées aux effluents après catalyse, cellules exposées aux COV seuls).

Les résultats finaux ont été exprimés sous forme de valeur de quantification relative (RQ). Cette dernière représente le niveau d'expression du gène dans les cellules exposées aux COV dilués ou aux flux gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène, comparé au même niveau d'expression des cellules exposées à l'air purifié.

3.4.6 Quantification des cytokines

La méthode ELISA (Enzyme Link Immunosorbant Assay) sandwich a été utilisée pour étudier la réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B après exposition aux COV dilués ou aux flux gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 ont ainsi été quantifiées dans les surnageants des inserts Transwell® en utilisant le kit ELISA MAX™ (BioLegend, Ozyme), selon les instructions du fabricant. Ainsi, un volume de 100 µL de surnageant contenant les cytokines ont été liées, en duplicat, à un anticorps primaire spécifique, préalablement fixé au fond d'une plaque 96 puits. Puis le complexe formé a été incubé avec un anticorps secondaire spécifique, appelé anticorps de détection, sur lequel est fixé de la biotine. Entre chaque étape, un lavage des puits a été effectué afin de retirer l'anticorps non fixé. Pour finir, le couplage de l'anticorps de détection avec une peroxydase induit la formation d'un complexe coloré, permettant ainsi la révélation des cytokines d'intérêt. La concentration a été mesurée avec un lecteur de microplaques Multiskan (Thermo Fisher Scientific), aux absorbances de 450 nm (intérêt) et 570 nm (référence). Les résultats sont exprimés en niveau d'induction de cytokines secrétées par les cellules exposées aux flux gazeux par rapport au niveau d'induction chez les témoins exposés à l'air. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en cytokines présentes dans les échantillons. La quantification des cytokines IL-6 et IL-8 est obtenue par comparaison avec une gamme d'étalonnage et l'utilisation d'une droite de régression polynomiale d'ordre 2.

Parallèlement, des cellules BEAS-2B cultivées dans des plaques 6 puits ont été exposées à 0,1 µg.mL⁻¹ de lipopolysaccharide bactérien (LPS). Ce test a été utilisé comme témoin positif et permet de vérifier la capacité des cellules BEAS-2B à induire une réponse inflammatoire. Une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 a été observée avec des taux d'induction 7,2 et 2,5 fois supérieurs aux cellules témoins non exposées (figure 29).

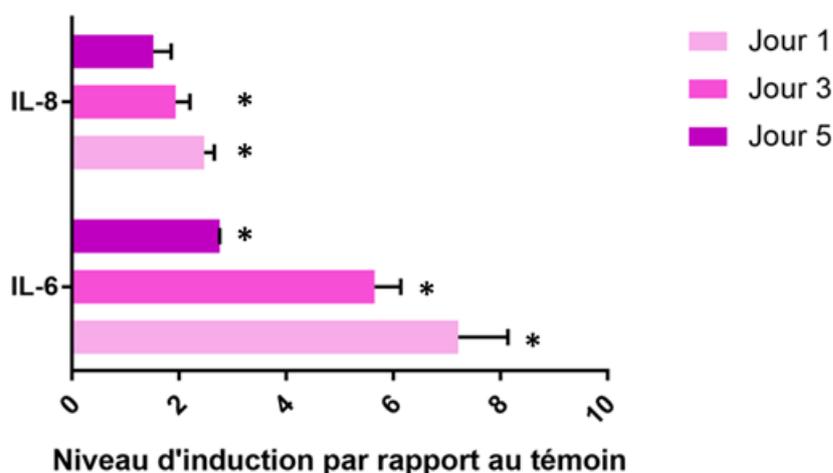


Figure 29 : Mesure de la sécrétion relative de cytokines (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules au à 0,1 µg.mL⁻¹ de lipopolysaccharide bactérien. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliqués biologiques (n = 3) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air purifié (test U de Mann-Whitney, * p<0.05)

Un suivi de la stabilité des cytokines IL-6 et IL-8 dans le temps et en présence des COV étudiés a également été réalisé. Ce test permet de vérifier l'absence d'interaction entre les cytokines testées et les composés étudiés et ainsi éviter les biais de détection. Pour effectuer ce test, des concentrations de 20 et 200 pg.mL^{-1} de chaque cytokine ont été mises en contact pendant 5 jours à 37°C avec chacune des molécules de COV à une concentration de 100 ppm. Une solution composée uniquement de milieu de culture et des standards de cytokines ont été utilisés comme contrôle. 100 μL de chaque condition ont été prélevés de J1 à J5 puis transférés dans une plaque 96 puits. Aucun changement significatif n'a été observé après quantification des niveaux des cytokines IL-6 et IL-8 mises en contact avec les molécules organiques par rapport au contrôle positif.

3.5. Analyses statistiques

Les opérations de calcul élémentaire et des estimateurs statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 7.05 (GraphPad Software, La Jolla, Californie).

Les données relatives à la cytotoxicité et aux études de prolifération ont été traitées par ajustement au modèle de Hill (Di Veroli et al., 2015; Weiss, 1997), afin de déterminer la concentration d'effet à 10 % (CE_{10}) pour l'air et pour la molécule de référence (toluène). Pour les effluents gazeux et pour les autres molécules testées, la cytotoxicité a été mesurée aux concentrations de l'étude (20 ppm, 100 ppm et 1 000 ppm, en fonction des tests réalisés) et sa valeur a été exprimée par le pourcentage de cytotoxicité moyen.

Pour les données d'analyse de l'expression génique, les résultats ont été obtenus en utilisant la méthode du $\Delta\Delta\text{C}_t$ (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008) calculée sur la valeur médiane des C_t obtenus sur les trois réplicats biologiques. Les résultats de quantité relative (RQ) ont été représentés par la valeur médiane associée à son quartile supérieur (Q3). En se basant sur cette méthode, la significativité est obtenue lorsque le RQ est supérieur à 2 ou inférieur à 0,5, représenté sur les graphiques par une ligne pointillée.

Pour les données de quantification des cytokines par la méthode ELISA, les résultats ont été décrits par le niveau d'expression relatif normalisé par rapport au témoin cultivé en ALI et exposé à l'air. Après vérification de la normalité de la distribution des données, les différences significatives ont été mises en évidence par le test U de Mann-Whitney ($p < 0.05$) entre témoin et exposé.

4. Optimisation des conditions de culture et d'exposition en système ALI

4.1 Concentration optimale

Afin de déterminer la concentration optimale d'ensemencement en vue des expositions répétées, 6 concentrations ont été testées : 190, 375, 750, 1 500, 3 000 et 6 000 cellules.cm⁻². Pour les concentrations de 3 000 et 6 000 cellules.cm⁻², 80 % de la confluence a été atteint avant 8 jours. En revanche, des modifications du comportement cellulaire et du phénotype ont été observées à partir du cinquième jour pour les plus faibles concentrations d'ensemencement, correspondant à 190, 375 et 750 cellules.cm⁻² (figure 30). En effet les BEAS-2B, cellules adhérentes, se sont développées en forme de grappes au lieu de recouvrir uniformément le fond du puits. Ainsi, une densité de 1 500 cellules.cm⁻² a été considérée comme étant la concentration optimale d'ensemencement des cellules. Dans ces conditions, 80 % de confluence a été atteint au 8^{ème} jour sans observation microscopique de changement morphologique et phénotypique (figure 30).

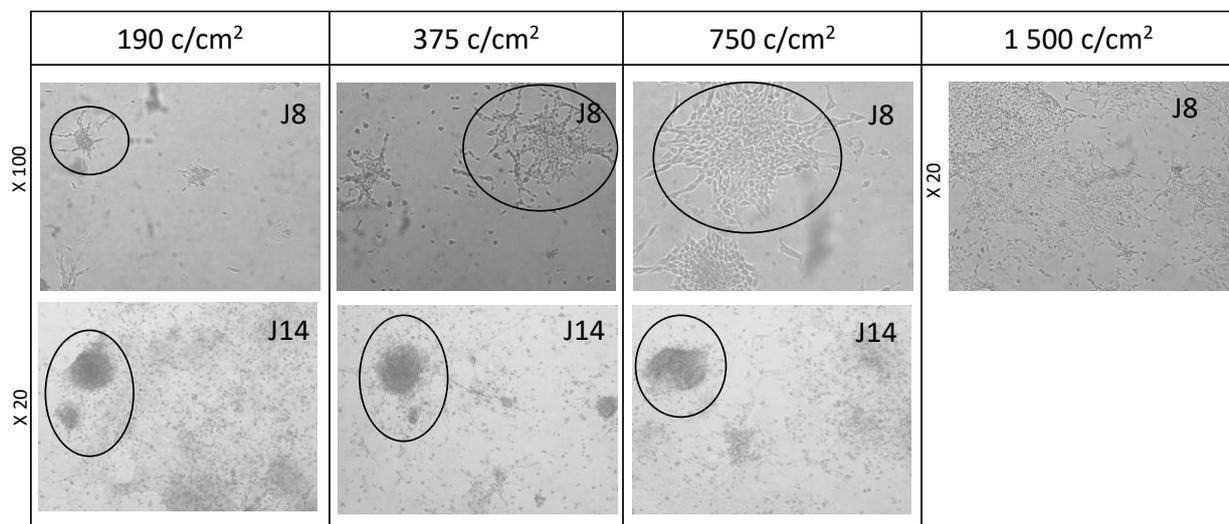


Figure 30 : Optimisation de la concentration cellulaire d'ensemencement des BEAS-2B sur insert. Observation en microscopie optique des cultures après 8 et 14 jours (grossissement x20 et x100)

4.2 Conditions d'exposition en système ALI

La mesure de la prolifération avec le test AlamarBlueTM et de la cytotoxicité par test LDH ont permis de déterminer le nombre de jours maximum d'exposition des cellules BEAS-2B avec le système Vitrocell[®] (figure 31). Les résultats de cytotoxicité obtenus de J1 à J5 indiquent un faible taux de mortalité des cellules lors des expositions à l'air filtré, identiques à ceux obtenus pour les témoins maintenus dans l'incubateur. L'index de prolifération est également resté stable durant les cinq premiers jours d'exposition. En revanche, une diminution de la croissance cellulaire et une augmentation du taux de LDH ont été observées à partir du 5^{ème} jour de culture que ce soit pour les cellules exposées ou les cellules témoins.

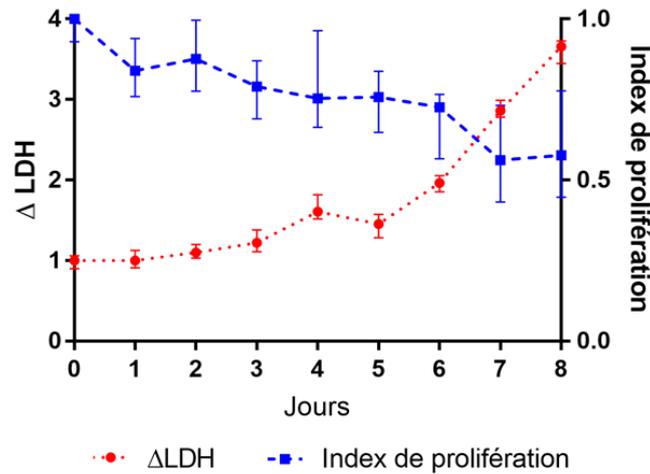


Figure 31 : Evaluation de la cytotoxicité estimée par la mesure de l'activité extracellulaire de la Lactate DésHydrogénase (LDH) et mesure de la prolifération cellulaire par le test AlamarBlue™ des cellules BEAS-2B cultivées sur inserts exposées à l'air filtré, 1h/jour pendant 8 jours. Les valeurs obtenues chaque jour (n=3) ont été comparées aux témoins incubateur et au triton X-100 (témoin positif de mortalité). L'ajustement de la courbe-réponse a été réalisé à l'aide du modèle d'équation de Hill, afin de déterminer la concentration d'effet à 10 % (CE₁₀).

L'observation microscopique des cellules BEAS-2B (figure 32) n'a pas montré d'effets délétères liés à l'exposition répétée ou à la culture sur insert des cellules BEAS-2B. En effet, aucun changement phénotypique n'a été observé après exposition des cellules au COV 1 heure par jour pendant 1, 3 ou 5 jours. Que ce soit pour la concentration de 100 ou 1 000 ppm de toluène, les cellules ont conservé la même morphologie pendant les 5 jours d'exposition.

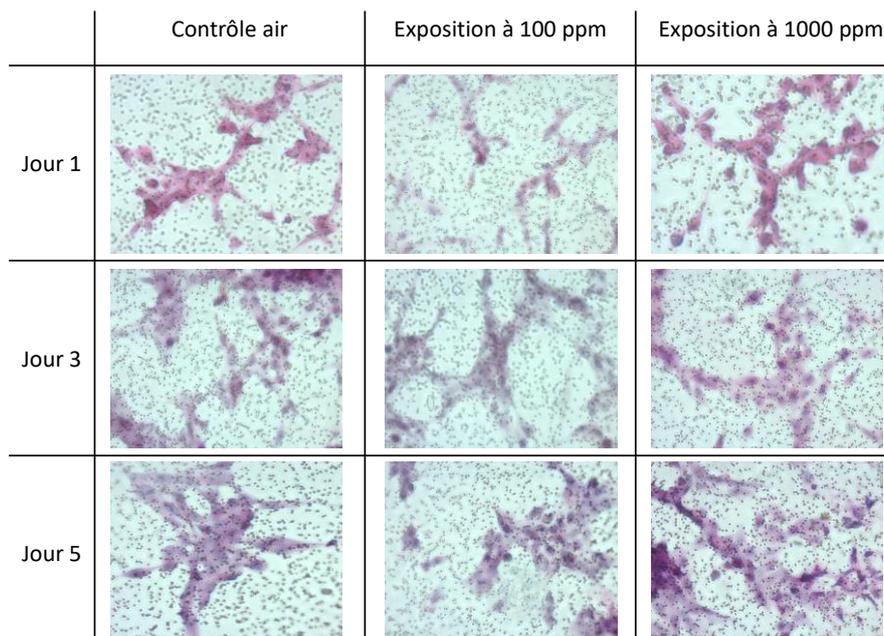


Figure 32 : Evaluation morphologique des cellules BEAS-2B à l'aide d'un microscope photonique (grossissement X100) après exposition des cellules au toluène pendant 1h et 1h/jour durant 3 et 5 jours.

Cette série d'optimisations nous ont permis de déterminer les conditions de culture des cellules BEAS-2B sur insert Transwell® et d'exposition répétée en ALI. Les conditions retenues sont une concentration d'ensemencement de 1 500 cellules.cm⁻² et une exposition de 1h/jour pendant 5 jours maximum. Ainsi pour un temps d'exposition de 5 jours, la concentration initiale sera de 500 000 cellules par insert. L'absence de modification morphologique des cellules et de cytotoxicité jusque 5 jours lors des expositions au toluène valide les conditions d'exposition en Interface Air-Liquide.

Chapitre 3 : Toxicité du benzène, du toluène, du m-xylène et du méesitylène

L'impact sur la santé humaine du benzène et du toluène, molécules régulièrement utilisées dans l'industrie depuis le XIX^{ème} siècle, est maintenant connu. C'est pourquoi, substituer ces molécules par des composés moins nocifs, comme par exemple le m-xylène ou le méesitylène, est l'une des solutions mises en place dans le secteur industriel. Cependant, un manque de connaissances demeure concernant l'effet de ces 4 hydrocarbures aromatiques sur l'appareil respiratoire. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier dans ce chapitre, la toxicité occasionnée par l'exposition à ces 4 composés sur des cellules épithéliales bronchiques humaines. Afin d'effectuer une étude comparative, des cellules BEAS-2B ont été exposées pendant 1 heure/jour durant 1, 3 ou 5 jours à deux concentrations de COV : 20 et 100 ppm. Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent respectivement aux valeurs de VLEP et VLCT du toluène. En parallèle, des cellules témoins ont été exposées à un flux d'air filtré dans les mêmes conditions expérimentales.

1. Métrologie des flux de COV gazeux

Un suivi de la stabilité des concentrations d'exposition en COV a été effectué par μ GC pendant toute la durée de l'expérimentation (tableau 12). Ainsi, les doses d'exposition mesurées de J1 à J5 sont proches de la valeur cible souhaitée, soit 100 ppm. Ces mesures valident donc nos conditions d'exposition. La plus faible concentration d'exposition, c'est-à-dire 20 ppm, a été réalisée par dilution à partir du flux à 100 ppm provenant du générateur de COV.

Tableau 12 : Suivi de la concentration en COV durant l'exposition en interface air-liquide. Les résultats représentent la valeur moyenne ainsi que l'intervalle de confiance à 95%

Molécules	Valeur cible	J1	J2	J3	J4	J5
Benzène	100 ppm	100,1	100,1	100,6	99,8	99,9
		[99,6 ; 100,5]	[99,6 ; 100,5]	[100,2 ; 101,1]	[99,2 ; 100,5]	[99,8 ; 100,1]
Toluène	100 ppm	100,0	100,0	100,0	100,0	100,1
		[99,9 ; 100,0]	[99,9 ; 100,0]	[99,8 ; 100,3]	[99,7 ; 100,3]	[99,9 ; 100,2]
m-Xylène	100 ppm	100,0	100,0	99,8	99,9	99,9
		[100,0 ; 100,1]	[100,0 ; 100,1]	[99,7 ; 99,8]	[99,9 ; 100,0]	[99,9 ; 100,0]
Méesitylène	100 ppm	99,9	100,2	99,7	100,2	100,3
		[99,9 ; 100,0]	[100,1 ; 100,3]	[99,4 ; 99,9]	[100,2 ; 100,3]	[100,2 ; 100,4]

2. Evaluation de la viabilité cellulaire

L'étude de l'intégrité des membranes plasmiques a été effectuée par mesure de la LDH extracellulaire après exposition aux COV. Le pourcentage de viabilité a été déterminé en utilisant le témoin air filtré comme valeur équivalente à 100 % de viabilité. En parallèle, un insert cultivé dans les mêmes conditions a été exposé pendant 30 min à une solution de triton X-100 afin d'obtenir une valeur équivalente à 0 % de viabilité. La quantification de la LDH mesurée dans le milieu de culture des cellules BEAS-2B exposées séparément aux 4 COV n'a montré aucun changement significatif par rapport à celle mesurée pour les cellules témoins exposées à l'air filtré. La membrane plasmique des cellules exposées n'a donc pas subi de lésions. En effet, nous avons pu vérifier que les valeurs de viabilité étaient toutes supérieures à 90 % après 5 jours d'exposition aux COV testés.

Ainsi, les quatre composés étudiés n'induisent pas d'altérations de l'intégrité membranaire des cellules dans ces conditions expérimentales (20 et 100 ppm, jusque 5 jours). Il s'avère ainsi que ces conditions d'exposition sont adaptées pour entreprendre l'évaluation des effets toxiques du benzène, du toluène, du m-xylène et du mésitylène, sur les cellules BEAS-2B.

3. Activation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques

Les niveaux d'expression de 10 gènes codant pour les enzymes impliquées dans la phase de fonctionnalisation des hydrocarbures aromatiques (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2E1*, et *CYP2S1*, *EPHX1*, *DHHDH*, *ALDH2* et *ALDH3B1*) et de 2 enzymes intervenant dans l'étape de conjugaison (*GSTM1* et *NQO1*) ont été mesurés après exposition des cellules BEAS-2B aux 4 COV (figure 33). Les résultats obtenus sont présentés dans les paragraphes suivants en fonction de l'ordre d'intervention des EMX dans le métabolisme des molécules. Ainsi, les premiers gènes intervenant dans la biotransformation de la molécule sont les *CYP* suivis par les enzymes induites par la formation de métabolites et enfin les 2 gènes de la phase II.

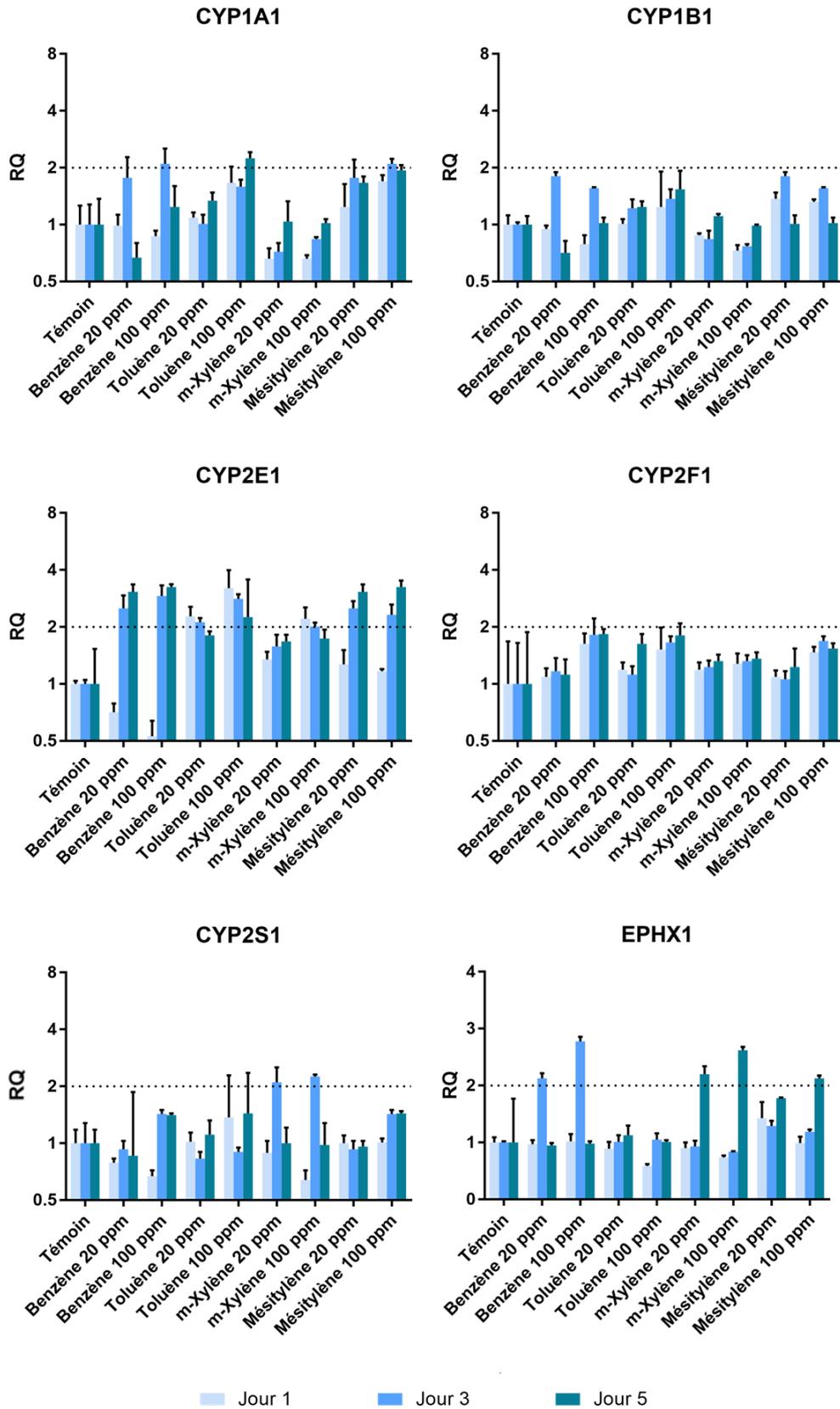


Figure 33 : Expression relative des EMX après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

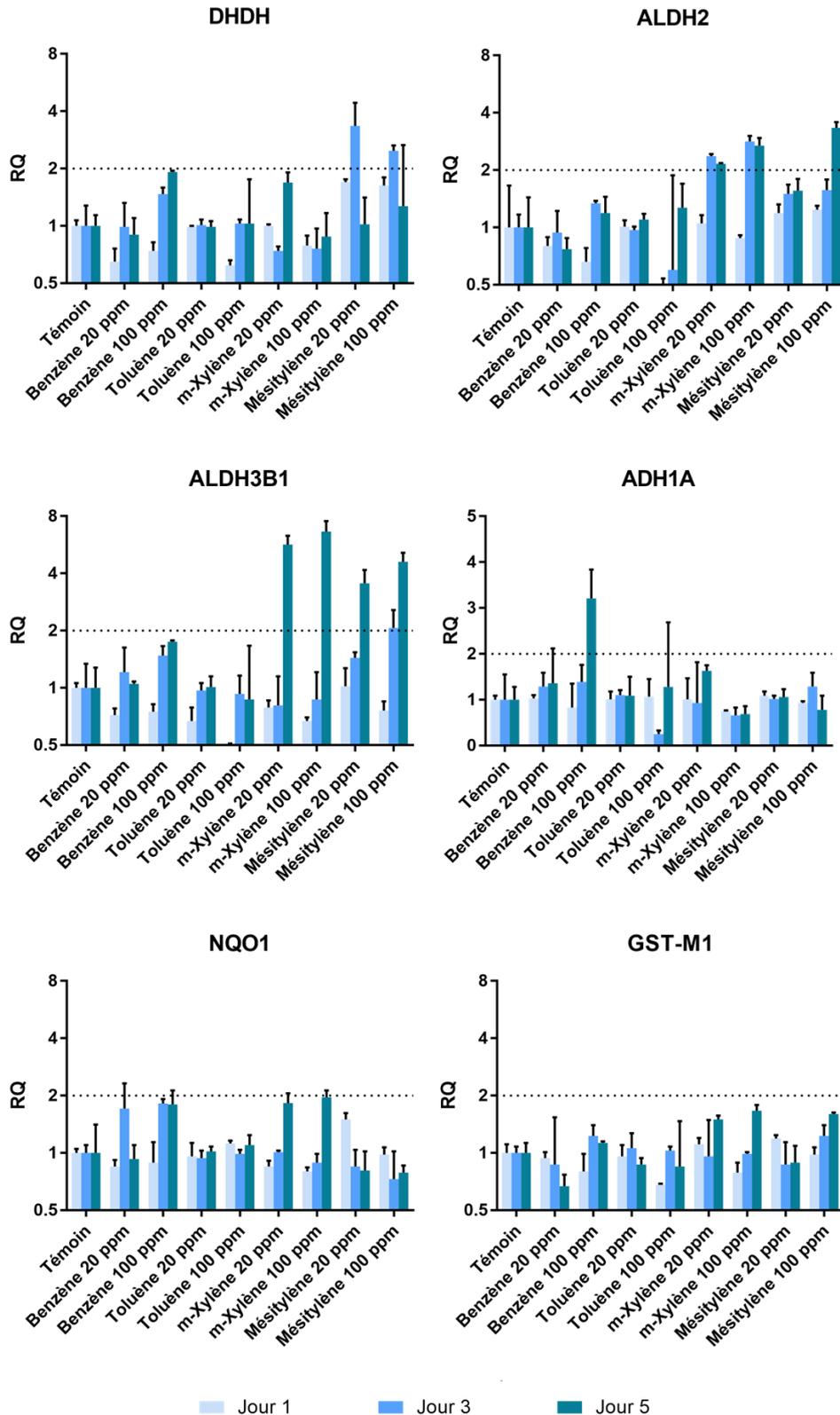


Figure 33 : Expression relative des EMX après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

L'exposition répétée des cellules aux 4 COV induit significativement l'expression de 3 gènes de la famille des cytochromes : *CYP2E1*, *CYP1A1* et *CYP2S1*. Cependant, les profils d'expression obtenus sont différents selon les molécules. Tout d'abord, l'exposition au benzène et au mésitylène entraîne une surexpression temps-dépendante du gène *CYP2E1* avec des valeurs de quantification relative significatives à J3 et J5. En revanche, une diminution au cours du temps du niveau d'expression de *CYP2E1* est observée pour les cellules exposées aux deux concentrations en toluène ou à 100 ppm de m-xylène. Les valeurs de RQ obtenues pour 20 ppm de toluène et 100 ppm de m-xylène ne sont d'ailleurs plus significatives à J5. Concernant *CYP1A1*, l'enzyme est exprimée significativement à J3 pour 100 ppm de benzène et de mésitylène avec un RQ égal à 2,1 pour les deux molécules. La plus forte concentration en toluène provoque également la surexpression de *CYP1A1*, lors du cinquième jour d'exposition. Enfin, *CYP2S1* est uniquement induit le 3^{ème} jour d'exposition pour les deux concentrations en m-xylène testées, avec des RQ de 2,1 et 2,3 respectivement. Enfin, nous n'avons pas observé de surexpression significative de *CYP1B1* et *CYP2F1* après exposition des cellules aux 4 COV par rapport aux cellules exposées à l'air filtré.

Une augmentation significative de l'expression du gène *EPHX1* est mesurée après exposition des cellules BEAS-2B au benzène (20 et 100 ppm), au m-xylène (20 et 100 ppm) et au mésitylène (100 ppm). Pour les deux concentrations en benzène, un profil en forme de « U inversé » est observé avec une expression significative uniquement à J3 (RQ = 2,1 à 20 ppm et 2,8 à 100 ppm). En revanche, la surexpression du gène observée pour le m-xylène et le mésitylène n'est obtenue qu'à l'issue d'expositions répétées, avec des valeurs significatives mesurées uniquement à J5. Les deux concentrations en mésitylène provoquent également la surexpression de *DHDH*, avec des valeurs de RQ obtenues à J3 supérieures à 2,0.

Les enzymes appartenant à la famille des aldéhydes déshydrogénases ont également été induites lors de l'exposition des cellules BEAS-2B au m-xylène et au mésitylène. Ainsi, *ALDH2* a été surexprimé à partir du troisième jour pour les deux concentrations en m-xylène (20 et 100 ppm). En revanche, une valeur de RQ significative n'a été observée que pour la concentration en mésitylène la plus élevée et uniquement à J5. Enfin, *ALDH3B1* est surexprimé le cinquième jour pour les expositions à 20 ppm de mésitylène et pour les deux concentrations en m-xylène. Toutefois, nous observons une surexpression significative dès J3 lors des expositions à 100 ppm de mésitylène. Pour les deux concentrations en m-xylène ainsi que pour la plus forte concentration en mésitylène, les RQ obtenues à J5 sont supérieurs à 4,0. Quant à *ADH1A*, cette enzyme a été induite à J5 lors des expositions des cellules BEAS-2B à 100 ppm de benzène. Pour finir, aucune variation de l'expression de *GSTM1* et *NQO1* n'a été mesurée après exposition des cellules aux 4 hydrocarbures aromatiques durant 1 heure/jour pendant 1, 3 ou 5 jours.

En guise de récapitulatif, l'exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène et au mésitylène met en évidence des différences dans l'expression des gènes codant pour les EMX selon la concentration du COV ou/la réalisation d'expositions répétées. L'expression de CYP2E1 est significativement induite pour les 4 composés étudiés, contrairement à CYP1A1 et CYP2S1. L'exposition au benzène et au mésitylène provoque également la surexpression de EPHX1 tandis le m-xylène et le mésitylène induisent significativement ALDH2 et ALDH3B1. Enfin DHDH est uniquement exprimée lors de l'exposition au mésitylène. Pour finir, aucun des COV n'induit significativement les gènes de la phase II, NQO1 et GSTM1.

4. Réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B

Le niveau d'expression des gènes *IL-6* et *IL-8* (figure 34), ainsi que le niveau relatif de la sécrétion extracellulaire des deux interleukines (figure 35) ont été mesurés après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène. Les résultats obtenus pour la quantification du niveau relatif de sécrétion protéique des interleukines après exposition des cellules ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour les cellules témoins. Toutefois, certaines tendances peuvent être observées. Préalablement aux mesures de sécrétion extracellulaire d'*IL-6* et *IL-8*, nous avons confirmé la capacité des cellules BEAS-2B à induire une réponse inflammatoire en exposant ces dernières à 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LPS. Nous avons également vérifié la stabilité dans le temps des 2 interleukines en présence des 4 COV étudiés (cf Chapitre II).

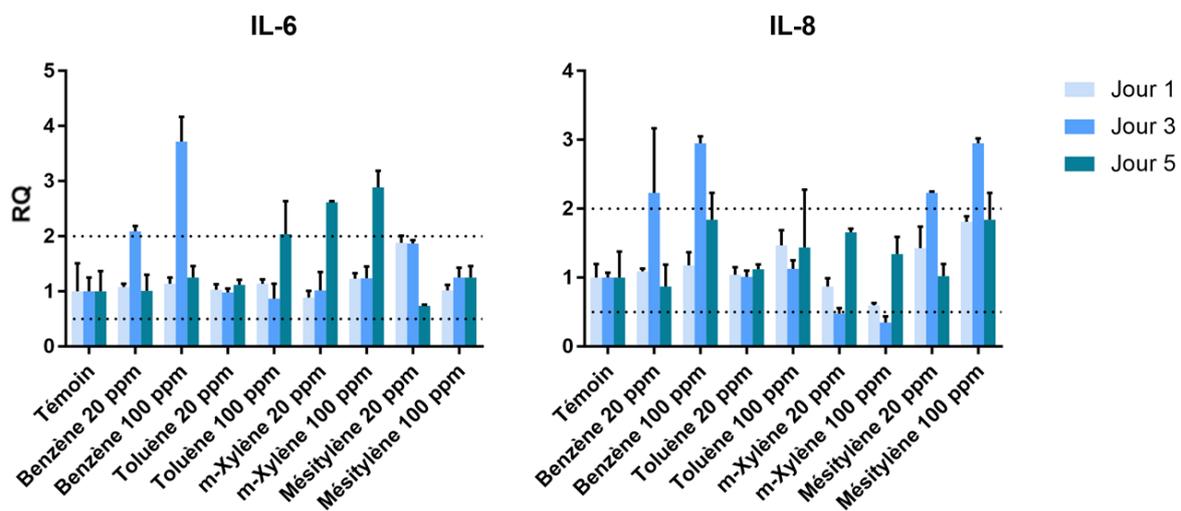


Figure 34 : Expression relative de 2 gènes de l'inflammation (*IL-6* et *IL-8*) après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

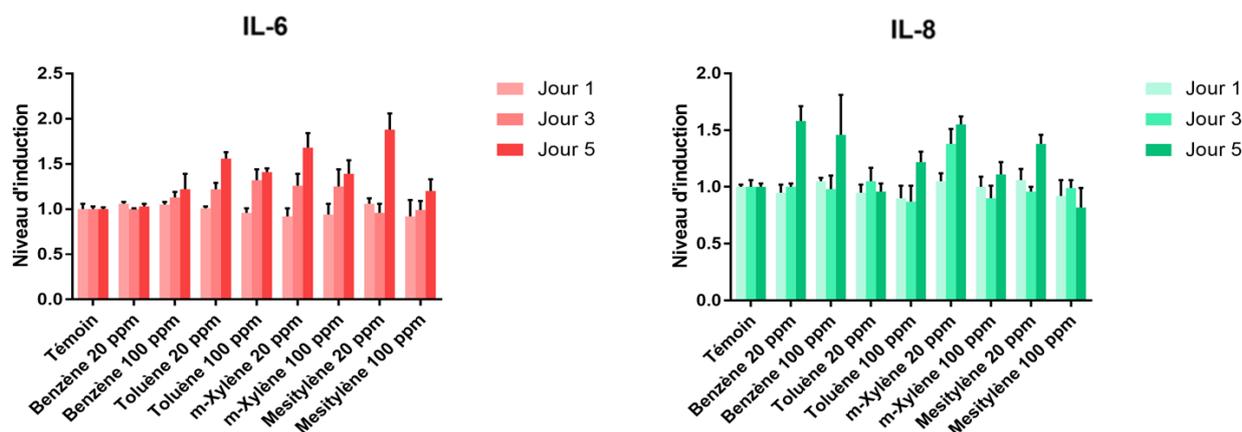


Figure 35 : Mesure de la sécrétion relative des interleukines (IL-6 et IL-8) après exposition des cellules au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. Les concentrations de cytokines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliques biologiques ($n = 3$) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air filtré. Aucune différence statistique n'a été observée (test U de Mann Whitney ; $p < 0,05$)

Les expositions répétées des cellules BEAS-2B à 100 ppm de toluène et à 20 ou 100 ppm de m-xylène ont provoqué une augmentation de l'expression dose- et temps-dépendante du gène *IL-6*, avec des valeurs de RQ respectives obtenues à J5 de 2,0, 2,6 et 2,9. Concernant le benzène, un profil du niveau d'expression d'*IL-6* en fonction du temps en forme de « U inversé » est observé pour les deux concentrations. En effet, seuls les résultats mesurés le troisième jour sont significatifs avec des valeurs de RQ égales à 2,1 pour 20 ppm et à 3,7 pour 100 ppm de benzène. Les expositions des cellules au mésitylène n'ont en revanche pas eu d'impact sur l'induction de cette cytokine pro-inflammatoire. Pour les composés toluène et m-xylène, la sécrétion relative de la cytokine semble également augmenter en fonction du temps d'exposition. Cette tendance est également observée pour la plus forte concentration en benzène et de mésitylène. En revanche, les différentes doses d'exposition ne semblent pas avoir d'effet sur la concentration extracellulaire d'*IL-6*.

Une augmentation significative du niveau d'expression du gène *IL-8* a uniquement été observée après exposition au benzène et au mésitylène (20 et 100 ppm), en mentionnant que le profil d'expression se présente en forme de « U inversé » et met en évidence cette surexpression uniquement à J3. Par ailleurs, l'expression du gène est dose-dépendante pour les deux composés. Ainsi, les valeurs de RQ obtenues à 20 et 100 ppm ne sont significatives que pour J3, soit respectivement 2,2 et 3,0 pour le benzène et pour le mésitylène. En ce qui concerne la quantification de la cytokine extracellulaire, une tendance à la sécrétion dépendante du temps est observée après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, ainsi qu'à 100 ppm de toluène et 20 ppm de m-xylène. L'exposition cellulaire à 100 ppm de m-xylène et 20 ppm de mésitylène semble provoquer la sécrétion de la cytokine avec un profil en forme de « U ». En revanche, un profil en forme de « U inversé » semble être obtenu lors de la mesure du niveau de sécrétion extracellulaire de *IL-8* pour les expositions à 100 ppm de mésitylène.

Une surexpression significative des gènes IL-6 et IL-8 est observée après exposition des cellules BEAS-2B aux différents COV et celle-ci diffère d'un composé à l'autre. Ainsi, le toluène et le m-xylène ont seulement induit le gène IL-6 avec une expression dépendante du temps et de la concentration. Une surexpression significative des gènes IL-6 et IL-8 lors du troisième jour d'exposition a ensuite été révélée lors de l'exposition cellulaire au benzène. Même si les résultats obtenus pour la sécrétion des interleukines ne sont pas significatifs, certaines tendances à la hausse de sécrétion ont été notées. En effet, le niveau de sécrétion d'IL-6 semble augmenter en fonction du temps pour chacune des 4 molécules. Quant à IL-8, son profil de sécrétion semble dépendre du COV avec des profils en forme de « U » ou « U inversé » observés respectivement pour 100 ppm de m-xylène ou 20 ppm de mésitylène et pour 100 ppm de mésitylène. La sécrétion extracellulaire de l'interleukine pour les autres conditions d'exposition semble être temps-dépendante.

5. Expression des mucines

L'expression de deux gènes codant pour des mucines, *MUC1* et *MUC5AC*, a été mesurée après exposition des cellules BEAS-2B aux COV. Les valeurs de quantification relative sont présentées sur la figure 36.

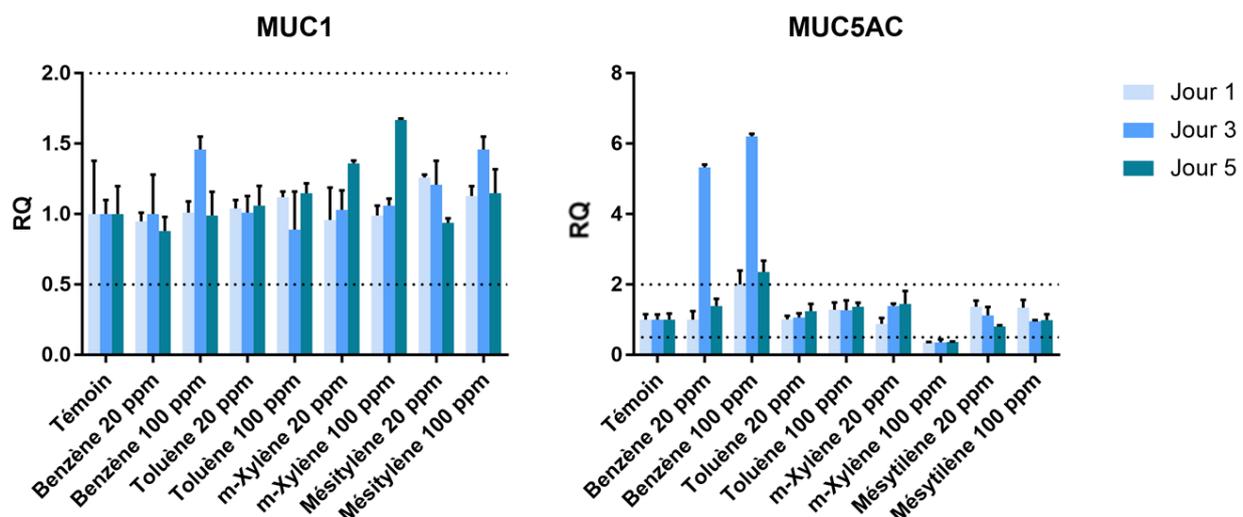


Figure 36 : Expression relative de 2 gènes des mucines (*MUC1* et *MUC5AC*) après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène (20 et 100 ppm) pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'induction des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Pour les 4 COV testés, aucune variation significative de l'expression de *MUC1* n'est observée de J1 à J5, entre les cellules exposées et les cellules témoins. En revanche, l'exposition aux différentes concentrations en benzène provoque la surexpression de *MUC5AC*. Ainsi, l'enzyme est induite significativement uniquement à J3 pour la plus faible concentration (20 ppm). A 100 ppm, *MUC5AC* est surexprimé à partir du premier jour

mais un profil en forme de « U inversé » est observé au cours du temps. En effet, les valeurs de RQ obtenues à J1, J3 et J5 sont respectivement égales à 2,0, 6,3 et 2,4. Une faible augmentation dépendante de la dose est également observée.

Pour les 4 hydrocarbures aromatiques étudiés, aucune expression significative de MUC1 n'a été mesurée pour les cellules exposées par rapport aux cellules témoins. En revanche, seule l'exposition des cellules BEAS-2B au benzène a induit significativement le gène MUC5AC.

6. Discussion

La substitution de composés toxiques par des molécules moins nocives pour la santé et pour l'environnement est l'une des exigences du règlement européen REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) (Schupp et al., 2017). Initialement utilisé dans les industries comme intermédiaires de synthèse ou comme solvant, le benzène, dont l'effet cancérigène est connu, et à présent le toluène, sont aujourd'hui remplacés par leurs homologues supérieurs tels que les xylènes ou les triméthylbenzènes. Pourtant peu d'études (*in vivo* ou *in vitro*) ont analysé l'effet toxique de ces 4 hydrocarbures aromatiques sur l'appareil respiratoire. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur l'effet du 1,3,5-triméthylbenzène (ou mésitylène) sur des cellules pulmonaires. C'est pourquoi, nous avons réalisé une évaluation toxicologique du benzène et du toluène, ainsi que de deux de leurs homologues : le m-xylène et le mésitylène.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons premièrement étudié la métabolisation des 4 composés organiques après exposition des cellules épithéliales BEAS-2B, 1 heure/jour pendant 1, 3 ou 5 jours avec le système Vitrocell®. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression génique de 12 EMX connues pour leur participation à la transformation métabolique des COV. Afin de réaliser la métabolisation des xénobiotiques, ces protéines doivent être fonctionnelles et ont été préalablement synthétisées grâce à la présence au sein du cytoplasme des ARNm codants pour ces enzymes (Fredrick and Ibba, 2009). Ainsi, le niveau d'expression du gène pourrait être en lien avec l'activation de la voie métabolique. Les EMX sélectionnées après analyse bibliographique, appartiennent aux 2 phases de réaction du métabolisme, c'est-à-dire la phase de fonctionnalisation (*CYP*, *Hydrolases*, *ADH* et *ALDH*) et la phase de conjugaison (*GST* et *NQO1*). Malgré leur homologie structurale, la biotransformation de ces 4 molécules en composés hydrophiles n'implique pas les mêmes EMX. En effet, les gènes codant pour les cytochromes P450 sont exprimés après exposition aux 4 composés mais avec des profils différents en fonction du temps et de la dose. En revanche, les gènes *ALDH2* et *ALDH3B1* sont surexprimés uniquement après exposition au m-xylène et au mésitylène

tandis que la surexpression de *EPHX1* n'est significative que pour le benzène et le xylène et celle de *DHHDH* que pour le mésitylène.

L'expression du gène *CYP2E1* a tout d'abord été évaluée. Ce dernier est l'un des principaux gènes de la phase I qui est induit après exposition à de nombreux solvants industriels, tels que les hydrocarbures substitués ou les hydrocarbures aromatiques (Pohl and Scinicariello, 2011; Tanaka et al., 2014). Excepté pour la plus faible concentration en m-xylène (20 ppm), *CYP2E1* a été significativement surexprimé après exposition des cellules BEAS-2B aux 2 concentrations en hydrocarbures aromatiques (20 et 100 ppm). Dans la littérature, une surexpression significative du gène lors d'expositions *in vivo* ou *in vitro* au benzène (Sheets et al., 2004), au toluène (Al Zallouha et al., 2017) ou au xylène (Maguin et al., 2006) a également été reportée. Cependant, des profils d'expression différents sont observés pour le toluène et le m-xylène par rapport au benzène et mésitylène. Tout d'abord, une diminution de l'expression en fonction du temps est observée pour le toluène et le m-xylène. Chez l'humain, les enzymes appartenant à la familles des CYP450 permettent de convertir respectivement le toluène et les xylènes en alcool benzylique ou en alcool méthylbenzylique (INRS, 2009c, 2012b) (figure 11 et figure 12). Toutefois, une seconde voie de métabolisation minoritaire peut être utilisée par les cellules et consiste en la formation de métabolites phénoliques par l'enzyme *CYP1A2* (Tassaneeyakul et al., 1996). Ainsi, il peut être suggéré que la diminution du niveau de *CYP2E1* observée au cours du temps dans notre étude pourrait être liée à l'activation d'une deuxième voie de biotransformation du toluène et du m-xylène par les cellules BEAS-2B. Concernant le benzène, *CYP2E1* est également surexprimé significativement. Ce gène peut-être lié à la transformation du benzène en son premier métabolite : le 1,2-époxybenzène (Kim et al., 2007). La surexpression de *CYP2E1* lors de l'exposition des cellules au mésitylène est similaire à celle obtenue pour le benzène, avec une augmentation de l'expression temps-dépendante et significative à partir de J3. A notre connaissance, aucune étude *in vitro* n'a porté sur la métabolisation du mésitylène. Il serait donc possible que la voie de biotransformation principale de ce dernier soit celle de l'oxydation, permettant la formation de l'alcool 3,5-diméthylbenzylique en tant que métabolite secondaire.

CYP1A1 a également été surexprimé suite à l'exposition des cellules à 100 ppm de benzène, de toluène et de mésitylène. Pour le toluène, la surexpression du gène est significative le cinquième jour. Des expérimentations *in vivo* effectuées sur le rat ont également montré une surexpression de *CYP1A1* après exposition d'animaux au toluène (Nakajima and Wang, 1994). D'après l'étude de Nakajima et Wang, *CYP1A1*, appartenant à la même famille de cytochromes que *CYP1A2*, participerait également au métabolisme du toluène puisque l'enzyme transformerait ce dernier en o-crésol ou p-crésol (composés phénoliques) (figure 11). Ainsi, cette observation peut être corrélée avec l'expression de *CYP2E1* discutée précédemment. En effet, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de *CYP2E1* au cours du temps pouvait être due à la mise

en place d'une voie de biotransformation secondaire correspondant à la formation de métabolites phénoliques. L'augmentation du niveau d'expression de *CYP1A1* après exposition répétée à des concentrations élevées en toluène pourrait indiquer le déclenchement de cette deuxième voie de biotransformation. En revanche, aucune différence significative d'expression de *CYP1A1* n'a été observée de J1 à J5 après expositions répétées des cellules BEAS-2B au m-xylène, suggérant ainsi que cette voie de biotransformation secondaire n'est pas activée dans ce cas. Concernant le benzène, *CYP1A1* a été surexprimé à J3 uniquement. Une étude a également remarqué que l'absence d'hématotoxicité chez des souris exposées au benzène pouvait être expliquée par la désactivation de l'Arylhydrocarbon Receptor (*AhR*), facteur de transcription connu pour réguler l'expression de *CYP1A1* (Ma, 2001; Yoon, 2002). Enfin, le profil de *CYP1A1* exprimé lors de l'exposition au mésitylène est identique à celui du benzène, avec une expression significative à J3 pour la plus forte concentration. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le benzène et le mésitylène partagent des voies de biotransformation. Ainsi, lors de l'exposition répétée de cellules épithéliales bronchiques à différents hydrocarbures aromatiques, ces dernières peuvent mettre en place différentes voies de métabolisation afin de faciliter la biotransformation des xénobiotiques et leur élimination.

Le gène *CYP2S1* est significativement exprimé lors de l'exposition des cellules au m-xylène (20 et 100 ppm) et ceci uniquement à J3. D'après la littérature, le gène codant pour cette EMX est principalement exprimé par les cellules épithéliales du système respiratoire et de l'appareil digestif (Saarikoski et al., 2005). Comme les enzymes appartenant à la famille des CYP1, son expression est régulée par l'*AhR* et il s'avère être impliqué dans la métabolisation des dioxines et des hydrocarbures aromatiques (Karlgrén et al., 2005; Saarikoski et al., 2005). Dans la littérature, les cytochromes dont l'expression génique est induite lors de l'exposition aux xylènes sont *CYP2E1* et *CYP2B1* (Kim et al., 2016). Aucune étude n'a, à notre connaissance, étudié l'expression du gène *CYP2S1* lors d'exposition à ces composés.

Le niveau d'expression de *CYP2F1* et *CYP1B1* a également été mesuré. Cependant, aucune différence significative d'expression n'a été observée pour ces deux EMX, après exposition des cellules au benzène ou à ses homologues supérieurs. D'après la littérature, l'enzyme *CYP2F1* intervient dans la biotransformation du benzène et du toluène (Al Zallouha et al., 2017; Sheets et al., 2004). Dans une précédente étude menée au laboratoire, une surexpression significative de *CYP2F1* avait été observée lors de l'exposition de cellules A549 à 1 000 ppm de toluène pendant 1 heure (Al Zallouha et al., 2017). Ainsi les concentrations en toluène et en benzène utilisées dans notre étude, soit 20 et 100 ppm, ne seraient pas assez élevées pour accroître significativement l'expression du gène *CYP2F1*. Concernant *CYP1B1*, ce dernier appartient à la même sous-famille que *CYP1A1*. Des études ont cependant montré que l'induction des gènes codant pour les enzymes *CYP1A1* et *CYP1B1* après exposition à un même xénobiotique pouvait être différente au sein des cellules

épithéliales pulmonaires. En effet, lors de l'exposition de cellules pulmonaires A549 à 10 nM de 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine, un niveau d'expression de *CYP1A1* plus important que pour *CYP1B1* a été observé (Hukkanen et al., 2000). Des résultats similaires ont été observés pour des cellules pulmonaires BEAS-2B exposées aux extraits organiques de particules atmosphériques, où le niveau d'expression génique de *CYP1A1* est supérieure à celui de *CYP1B1* (Billet et al., 2018). Il semblerait donc que les hydrocarbures aromatiques monocycliques provoquent majoritairement une surexpression de *CYP1A1* et aient peu d'impact sur l'expression de *CYP1B1*.

Les réactions de la phase I de biotransformation des xénobiotiques peuvent également être effectuées par des enzymes n'appartenant pas à la famille des CYP, comme par exemple *EPHX1* ou *DHDH*. Tout d'abord, le gène codant pour l'enzyme *EPHX1* a été surexprimé lors des expositions aux deux concentrations de benzène mais uniquement pour J3. Cette enzyme est connue pour intervenir dans le métabolisme du benzène (Kim et al., 2007), puisqu'elle permet la biotransformation du 1,2-époxybenzène, premier métabolite du benzène, en benzène dihydrodiol (figure 10). Nos observations suggèrent, pour le modèle cellulaire BEAS-2B, la mise en place de différentes voies de métabolisation du benzène réalisées par les EMX. En effet, *CYP2E1* transforme le benzène en 1,2-époxybenzène puis *CYP1A1* et *EPHX1* permettent de transformer respectivement ce dernier en métabolite phénolique ou en benzène dihydrodiol. *CYP2E1* peut également jouer un rôle dans l'étape précédant la phase de conjugaison et d'élimination en convertissant le phénol en hydroquinone. En revanche *DHDH*, qui intervient également dans la dernière étape de fonctionnalisation, n'a pas été induit par le benzène. Il est néanmoins connu que ce gène participe à la transformation du benzène dihydrodiol en catéchol (INRS, 2011d; Kim et al., 2007). Nos résultats ont également montré que les deux gènes *EPHX1* et *DHDH* étaient surexprimés lors des expositions au mésitylène tandis que seul *EPHX1* était exprimé lors d'exposition au m-xylène. Il est donc possible qu'une voie différente de l'oxydation ou de l'hydroxylation soit utilisée lors de la transformation métabolique de ces deux COV. En effet, les principaux métabolites connus pour ces deux composés, comme par exemple l'alcool 1,3-méthylbenzylique ou le 1,3,5-triméthylphénol, sont issus de réactions induites par les *CYP450* (Fishbein, 1985; INRS, 2004, 2009c).

Les gènes appartenant à la famille des *ADH* (alcools déshydrogénases) ou des *ALDH* (aldéhydes déshydrogénases) ont un rôle dans le métabolisme du toluène, du xylène et du mésitylène. En effet, les enzymes *ADH* permettent de transformer l'alcool benzylique en benzaldéhyde tandis que les aldéhydes déshydrogénases convertissent ces derniers en acide benzoïque (figure 11, figure 12 et figure 13). Lors de la métabolisation du xylène et du mésitylène, les métabolites secondaires formés ont respectivement un ou deux groupements méthyl supplémentaires par rapport aux métabolites du toluène. Dans notre étude, nous avons mesuré l'expression de trois enzymes appartenant à ces familles : *ADH1A*, *ALDH2* et *ALDH3B1*. Tout

d'abord, *ALDH2* et *ALDH3B1* n'ont été surexprimés que par l'exposition des cellules au m-xylène et au mésitylène. Ces enzymes ont une affinité pour les aldéhydes, comme par exemple l'acétaldaldéhyde (Marchitti et al., 2008). La présence de groupements méthyl au niveau des composés peut-être à l'origine de la surexpression des deux gènes. En effet, l'exposition de cellules épithéliales bronchiques HBE à de l'arsenic, de l'acide monométhylarsonique et de l'acide diméthylarsonique a révélé une surexpression significative de *ALDH2* seulement dans le cas du composé diméthylé (Dodmane et al., 2013), ce qui tend montrer l'influence de la présence de groupements méthyl sur le niveau d'expression de *ALDH2*. En revanche, *ADH1A* est exprimé lors de l'exposition des cellules au benzène. La métabolisation de ce dernier conduit à la formation du 1,2-benzène époxyde, métabolite réactif, pouvant induire des cancers (Melnick, 2006). Par ailleurs, un réarrangement non enzymatique permet de transformer cet époxyde en phénol (Eastmond, 1987), ce qui pourrait induire l'expression d'alcools déshydrogénases comme *ADH1A* dans notre cas. Concernant les autres composés étudiés, aucune modification de l'expression de *ADH1A* n'est observée pendant les cinq jours d'exposition. Pourtant, l'expression significative des aldéhydes déshydrogénases suggère la présence du métabolite benzaldéhyde dans les cellules BEAS-2B, ce dernier étant le produit de la transformation par les alcools déshydrogénase de l'alcool benzylique. Il serait donc intéressant de tester d'autres gènes exprimés dans les tissus pulmonaires appartenant à la famille des ADH, comme par exemple *ADH1B*, *ADH5* ou *ADH7*.

Pour les 4 COV étudiés, l'expression de *NQO1* et *GSTM1* n'a montré aucune différence significative au cours du temps par rapport aux cellules exposées à l'air filtré. Ces deux gènes ont été sélectionnés puisqu'ils codent pour les enzymes participant aux étapes de conjugaison de nombreux xénobiotiques (Jancova et al., 2010; Kim et al., 2007). En effet, l'enzyme *NQO1* est impliquée dans la réduction des molécules chimiques composées d'un groupement quinone en hydroquinone (de Oliveira et al., 2018). Cette transformation empêche la formation d'espèces électrophiles susceptibles de former des adduits à l'ADN, ainsi que des ERO, ce qui diminue le risque de générer un stress oxydant dans les cellules. *GSTM1* est l'une des principales enzymes de détoxification de la phase II. Elle intervient dans un grand nombre de réactions, comme par exemple la réaction de glucoconjugaison avec des métabolites hydrophobes formés par les EMX de la phase I. *GSTM1* joue également un rôle dans la défense de la cellule contre le stress oxydant (Jancova et al., 2010). L'absence de différence significative dans l'expression des deux gènes de la phase II après exposition des cellules aux COV n'exclut pas la mise en place de réactions de détoxification cellulaire. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression des protéines intervenant dans la phase II du métabolisme des xénobiotiques, telles que *NQO1*, *GST*, *UGT* ou *MPO*.

Le niveau d'expression relatif des 12 EMX mesurés après 1, 3 ou 5 jours d'exposition au toluène, au benzène, au m-xylène ou au mésitylène est résumé dans le tableau 13. Les expositions répétées ont permis de mettre en évidence l'expression tardive de certains gènes tels que *CYP1A1* et *EPHX1*, pouvant suggérer

ainsi l'utilisation par les cellules BEAS-2B de différentes voies de métabolisation pour la biotransformation d'un même composé. Par exemple, le toluène peut être métabolisé en alcool benzylique par *CYP2E1* ou en composés phénoliques lors de l'activation de *CYP1A1*. Quant au benzène, sa transformation en 1,2-époxybenzène puis en benzène dihydrodiol pourrait être liée à l'expression génique de *EPHX1*. Les résultats d'expression génique obtenus après exposition des cellules au m-xylène ou au mésitylène suggèrent la mise en place de voies de métabolisation identiques à celles utilisées par les cellules lors de l'exposition au toluène. Pour finir aucune surexpression de *NQO1* et *GSTM1*, deux enzymes intervenant dans l'étape de conjugaison, n'a pu être observée pendant les cinq jours d'exposition. Des expérimentations supplémentaires devront donc être effectuées, comme l'évaluation de l'expression protéique de ces deux EMX.

Tableau 13 : Expression relative des gènes codant pour les EMX après exposition des cellules BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. L'expression des 12 gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique des C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation (= : aucune différence significative ; - : RQ < 0,5 ; + : RQ > 2 ; ++ : RQ > 4)

Jours	Benzène 20 ppm			Benzène 100 ppm			Toluène 20 ppm			Toluène 100 ppm			m-Xylène 20 ppm			m-Xylène 100 ppm			Mésitylène 20 ppm			Mésitylène 100 ppm		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
<i>CYP1A1</i>	=	=	=	=	+	=	=	=	=	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=
<i>CYP1B1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>CYP2E1</i>	=	+	+	=	+	+	+	+	=	+	+	+	=	=	=	+	+	=	=	+	+	=	+	+
<i>CYP2S1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=
<i>CYP2F1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>EPHX1</i>	=	+	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	=	=	=	=	+
<i>NQO1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>GSTM1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>DHHDH</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=
<i>ADH1A</i>	=	=	=	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
<i>ALDH2</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	+	=	+	+	=	=	=	=	=	+
<i>ALDH3B1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	++	=	=	++	=	=	+	=	=	++

Nous nous sommes également intéressés aux propriétés inflammatoires des 4 composés aromatiques. Lors du processus d'inflammation, les cellules sécrètent de nombreux médiateurs tels que les cytokines et les chimiokines (Yu, 2002). Parmi les interleukines pro-inflammatoires, IL-6 et IL-8 sont régulièrement examinées dans les études toxicologiques sur les COV (Bardet et al., 2014; Fischäder et al., 2008; Pariselli et al., 2009b) et peuvent-être induites et sécrétées par plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales pulmonaires.

L'interleukine IL-6 est, avec TNF- α et IL-1, l'un des principaux médiateurs sécrétés lors de la mise en place de l'inflammation (Tanaka et al., 2014; Yu, 2002). Cette cytokine pro-inflammatoire intervient dans plusieurs fonctions, telles que l'induction des réactions inflammatoires aiguës ou encore la régulation des réponses immunologiques (Kishimoto et al., 1992). Elle est libérée par un grand nombre de cellules comme par exemple les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales ou encore les cellules malignes. L'interleukine 8, IL-8, appartient au groupe des chimiokines (Fischäder et al., 2008) et a pour rôle de recruter les leucocytes sur les sites d'inflammation aiguë grâce à l'utilisation d'un gradient chimiotactique. Cette dernière est peu détectable dans les cellules saines mais une large variété de stimuli, tels que la présence de cytokines pro-inflammatoires et d'agents viraux ou encore l'induction d'un stress cellulaire provoque rapidement son induction (Hoffmann et al., 2002).

Ainsi, ces deux marqueurs de l'inflammation ont été mesurés après exposition répétée des cellules épithéliales BEAS-2B au benzène, au toluène, au m-xylène ou au mésitylène. La sécrétion extracellulaire de leurs interleukines respectives a également été évaluée dans les surnageants de culture. Parallèlement aux expositions, les cellules BEAS-2B ont été exposées au LPS ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilisé comme témoin positif afin de vérifier la capacité des cellules BEAS-2B à induire une réponse inflammatoire. Une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 a été observée par rapport aux cellules témoins non exposées. D'autres études ont également évalué la réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B avec le LPS (Longhin et al., 2018). La capacité des cellules BEAS-2B à induire une réponse inflammatoire a ainsi été mise en évidence, validant notre modèle d'étude.

L'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux 4 hydrocarbures aromatiques n'induit pas les marqueurs de l'inflammation IL-6 et IL-8 de la même façon. En effet, le toluène et le m-xylène provoque la surexpression du gène codant pour la cytokine pro-inflammatoire *IL-6*, avec une augmentation en fonction du temps et de la concentration tandis que seule l'expression du gène codant pour la chimiokine *IL-8* est induite par le mésitylène. Les deux interleukines sont également exprimées lors des expositions à 20 ou 100 ppm de benzène. Ainsi, la surexpression de ces deux médiateurs inflammatoires démontre bien le pouvoir inflammatoire des hydrocarbures aromatiques. Ce résultat est en accord avec les conclusions présentées dans les études épidémiologiques (Billionnet et al., 2011; Rumchev, 2004) ou *in vivo* (Wang et al., 2014).

Cependant, aucun changement significatif de la concentration en IL-6 et IL-8 n'a été observé après expositions des cellules BEAS-2B aux hydrocarbures aromatiques. Pour des concentrations en composés similaires à celles de notre étude (m-xylène, styrène et chlorobenzène), une absence de sécrétion des interleukines 6 et 8 dans des cellules A549 exposées de manière immergée, a également été observée (Fischäder et al., 2008). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette absence de sécrétion significative. Tout

d'abord, nos conditions expérimentales peuvent ne pas correspondre à la cinétique de sécrétion des deux interleukines. En effet, nous avons choisi de récupérer les surnageants et les cellules 5 h après la fin des expositions. Ce choix a été fait en prenant en compte l'expression rapide de certains gènes codant pour les EMX, tels que *CYP2E1*. Cependant, des études ont montré que les concentrations en IL-6 et IL-8, dans des expectorations prélevées chez des volontaires exposés à des particules de diesel, étaient plus importantes à partir de 24 h (Nordenhäll et al., 2000). La mesure de plusieurs médiateurs de l'inflammation dans des surnageants de cultures primaires de cellules nasales prélevées chez des individus atteints de maladies respiratoires, a montré une plus forte sécrétion de IL-6 après 8 et 16 jours de culture respectivement par rapport aux premières heures (Kenney et al., 1994). Enfin, la présence ou l'absence de sécrétion des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires peuvent être reliées à la présence dans les cellules, de certains métabolites issus de la métabolisation des COV. En exemple, une production plus importante de IL-8 par des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) a été observée en présence de l'hydroquinone par rapport aux autres métabolites du benzène, tels que le catéchol (Gillis et al., 2007).

Pour finir, les profils en forme de « U inversé » obtenus pour les deux interleukines après exposition des cellules BEAS-2B au benzène et au mésitylène ne sont pas encore totalement élucidés. Toutefois quelques pistes peuvent être envisagées. D'abord, le lien entre la variation du ratio GSH/GSSG et la régulation du processus inflammatoire dans le poumon a été établi (Rahman and MacNee, 2000). Pariselli et al. ont également observé une modification du taux de glutathion intracellulaire causée par l'exposition en mode ALI de cellules A549 au benzène et au toluène (Pariselli et al., 2009b). Ensuite, la sécrétion de protéines de la famille des mucines induirait une diminution de la sécrétion des interleukines, telles que IL-8, dans des modèles *in vivo* (Kennedy et al., 1998). Ces protéines ont pour rôle de diminuer les lésions inflammatoires des cellules, comme la sécrétion des interleukines pro-inflammatoires (Turner et al., 2014), et réguler l'expression du gène codant pour la mucine dans le poumon par IL-8 (Bautista et al., 2009) ou IL-6 (Chen et al., 2003). L'un des mécanismes de défense mis en place par l'épithélium pulmonaire, lors d'expositions à des molécules exogènes, correspond en effet à l'élimination de ces dernières grâce à la clairance mucociliaire (Hiemstra et al., 2015). Ainsi, nous avons évalué l'expression des gènes de 2 mucines pouvant être induits dans les cellules BEAS-2B (Noah et al., 1995; Podder et al., 2014) : *MUC5AC* et *MUC1* appartenant respectivement aux familles des mucines sécrétées et des mucines épithéliales membranaires.

Pour les expositions des cellules aux 4 COV, l'expression de *MUC1* n'a pas montré de changement significatif par rapport aux cellules exposées à l'air filtré. Ce gène code pour les mucines épithéliales membranaires et peut être détecté en grandes quantités dans le mucus (Porchet and Aubert, 2004). A la différence des mucines sécrétées, les mucines membranaires sont exprimées par de nombreux tissus épithéliaux, tels que les épithéliums pulmonaires, digestifs ou encore hépatiques. De plus, l'expression de

MUC1 est faible au sein des épithéliums normaux, mais une augmentation de sa production peut être liée à son rôle anti-inflammatoire ou bien être corrélée à la progression des maladies cancéreuses (Kato et al., 2017; Lakshmanan et al., 2015). La non-expression de *MUC1* peut également être liée à la surexpression du gène *IL-6* lors des expositions au benzène, au toluène ou au m-xylène. En effet, *MUC1* est régulé, au sein des cellules normales ou cancéreuses, par un certain nombre de régulateurs inflammatoires comme *IL-6* (Albertsmeyer et al., 2010). En revanche, *MUC5AC* a été surexprimé lors des expositions au benzène. *MUC5AC* est l'une des principales mucines sécrétées présentes dans les expectorations des personnes asthmatiques (Hiemstra et al., 2015). Dans notre étude, le profil d'expression de *MUC5AC* est similaire à ceux obtenus pour les deux enzymes de l'inflammation *IL-6* et *IL-8*, avec une surexpression des 3 gènes observée à J3. Ainsi, il semble que l'induction d'*IL-6* et *IL-8* provoquée par l'exposition répétée aux COV, stimule la surexpression des gènes des mucines, comme *MUC5AC*. En effet, l'induction des mucines par les médiateurs pro-inflammatoires est l'une des principales causes de surproduction du mucus dans les cas de maladies inflammatoires (Bautista et al., 2009; Chen et al., 2003).

Chapitre 4 : Toxicité des effluents gazeux après traitement catalytique du toluène

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au traitement du toluène par oxydation catalytique et plus précisément à la potentielle toxicité des effluents gazeux obtenus à l'issue de cette réaction. Pour cela, trois expositions cellulaires ont été réalisées : une exposition au toluène non traité (100 et 1 000 ppm) et deux expositions après traitement catalytique du toluène, correspondant respectivement aux effluents gazeux après utilisation d'un catalyseur commercial (Pd/ γ -Al₂O₃) et d'un catalyseur à base d'oxyde de métal de transition supporté sur de l'alumine (Co₆Al₂-O) synthétisé par l'équipe TCEP de l'UCEIV (Chapitre 2). La concentration en toluène en amont des catalyseurs était de 1 000 ppm. Les expositions cellulaires ont été réalisées en considérant d'une part l'effluent gaz issu de la réaction catalytique et d'autre part un mélange constitué de 10 % d'effluent et de 90 % d'air filtré. En parallèle, des cellules ont été exposées à l'air et sont utilisées comme témoin dans les analyses toxicologiques présentées dans ce chapitre 4. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal international « *Toxicology In Vitro* » (Méausoone et al., 2019).

1. Métrologie des flux de COV gazeux

Lors des expositions des cellules BEAS-2B au toluène sans traitement catalytique, nous avons effectué un suivi de la concentration du composé gazeux en sortie du générateur de COV (tableau 14). Les concentrations d'exposition mesurées pendant les cinq jours d'expositions sont comprises entre 999,6 et 999,8 ppm et sont donc proches de la valeur cible correspondant à 1 000 ppm. La dose de 100 ppm, correspondant à notre deuxième concentration d'exposition, a été obtenue par dilution du mélange gazeux contenant 1 000 ppm de toluène. Ces mesures permettent de s'assurer du respect de la concentration ciblée au cours des expositions.

Tableau 14 : Suivi de la concentration en toluène durant l'exposition en interface air-liquide. Les résultats représentent la valeur moyenne ainsi que l'intervalle de confiance à 95%

Molécule	Valeur cible	J1	J2	J3	J4	J5
Toluène	1000 ppm	999,6	999,8	999,6	999,7	999,8
		[887,6 ; 1111,6]	[999,5 ; 1000,0]	[943,7 ; 1055,5]	[999,5 ; 999,8]	[950,0 ; 1049,6]

2. Analyse chimique des effluents issus de l'oxydation catalytique du toluène.

En parallèle des expositions cellulaires, une analyse chimique de l'effluent gazeux issu du traitement catalytique a été réalisé afin de mettre en évidence la présence potentielle de toluène non-converti et/ou de sous-produits formés lors de la réaction (figure 37 et tableau 15). Pour cela, un piégeage des composés sur une cartouche adsorbante TenaxTM a été réalisé avant de procéder à leur analyse par la technique GC-MS.

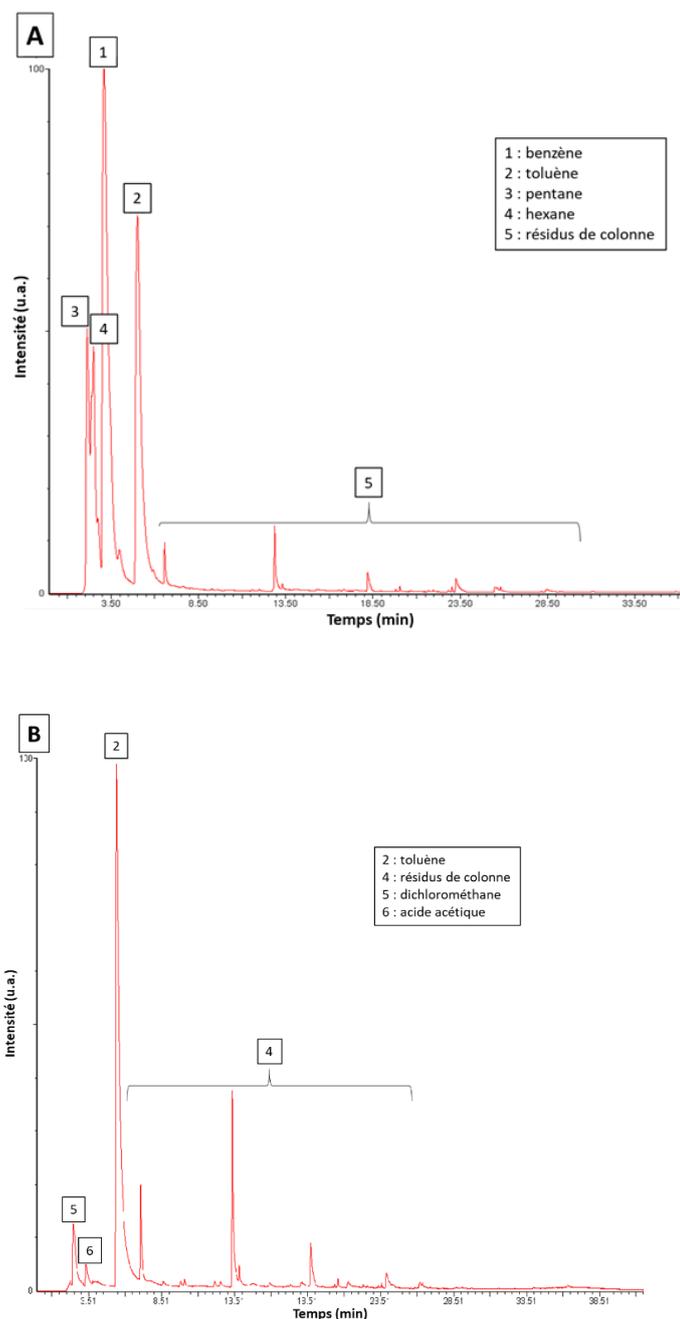


Figure 37 : Chromatogrammes obtenus pour l'analyse par GC-MS des effluents gazeux après réaction en présence du catalyseur Pd/γAl₂O₃ (A) et du catalyseur Co₆Al₂O (B)

Tableau 15 : Concentration (en ppb) du toluène non converti et des sous-produits présents dans les effluents issus du traitement catalytique du toluène en présence du catalyseur Pd/ γ Al₂O₃ (T_{exp} = 260°C) et du catalyseur Co₆Al₂-O (T_{exp} = 350°C) (<LD : sous la limite de détection)

	Toluène (ppb)			Benzène (ppb)			Acide acétique (ppb)		
	J1	J3	J5	J1	J3	J5	J1	J3	J5
Pd/γAl₂O₃	239	228	265	549	447	396	<LD	<LD	<LD
Co₆Al₂-O	96	90	46	<LD	<LD	<LD	659	170	<LD

En utilisant chacun des catalyseurs, la conversion du toluène est très élevée (Pd/ γ Al₂O₃ : 99, 97% et Co₆Al₂-O : 99,99%) mais n'est cependant pas totale. La quantité la plus élevée en toluène non-converti est retrouvée dans les effluents gazeux obtenus en utilisant le catalyseur Pd/ γ Al₂O₃. La concentration dans le flux gazeux est stable pendant les 5 jours d'analyse, avec une quantification comprise entre 228 et 265 ppb. Lorsque la réaction d'oxydation est réalisée en utilisant le catalyseur Co₆Al₂-O, la concentration de toluène dans l'effluent gazeux est plus faible comparée à celle mesurée avec le catalyseur Pd/ γ Al₂O₃. De plus, une diminution est observée entre J1 et J5 (soit 96 ppb à 46 ppb).

L'analyse chimique a également permis d'identifier 4 sous-produits : le benzène, l'acide acétique, le pentane et l'hexane. La présence du benzène est uniquement observée après oxydation catalytique du toluène avec le catalyseur commercial Pd/ γ Al₂O₃. Sa concentration dans le flux de gaz diminue au cours du temps, passant de 549 ppb après J1 à 396 ppb après J5. Deux composés de la famille des alcanes, le pentane et l'hexane, ont également été formés lors de la réaction catalytique. Leur quantification n'a pas été réalisée. L'acide acétique formé en présence du catalyseur Co₆Al₂-O, a une concentration de 659 ppb lors du premier jour d'exposition. Toutefois, cette dernière diminue rapidement dans le temps et le composé n'est plus quantifiable à J5. La présence de dichlorométhane (DCM) a également été détectée sur le chromatogramme du catalyseur Co₆Al₂-O. Ayant été détecté lors de l'analyse du blanc de cartouche TENAX™ réalisé préalablement à l'adsorption des composés présents dans l'effluent, le DCM ne provient pas de l'oxydation du toluène.

L'analyse chimique a révélé la présence de toluène non-converti et la formation de 4 sous-produits pour les deux catalyseurs testés. Toutefois, les concentrations mesurées en sortie de réacteur après réaction catalytique sont de l'ordre du ppb (part per billion), alors que la concentration initiale en toluène était de 1 000 ppm. Les catalyseurs ont donc une efficacité élevée dans la dégradation du toluène. Les analyses toxicologiques présentées dans la suite du chapitre permettront de comparer les deux catalyseurs en considérant les effets toxiques et les réponses biologiques observées quand les cellules épithéliales BEAS-2B sont exposées aux effluents gazeux obtenus après la réaction catalytique.

3. Evaluation de la viabilité cellulaire

La quantification de la LDH dans le milieu extracellulaire n'a montré aucun changement significatif, ce qui suggère qu'il n'y a pas eu d'altérations de l'intégrité membranaire des cellules exposées aux différents effluents gazeux testés (air filtré, toluène dilué ou effluents après oxydation catalytique). En effet, un taux de LDH inférieur à 10 % par rapport au contrôle positif a été observé après 5 jours d'exposition des cellules aux deux effluents issus des réactions catalytiques. Pour les cellules exposées 1h/jour pendant 5 jours à 1 000 ppm de toluène, la concentration en LDH dans le milieu de culture était inférieure à 20 %.

Ainsi, la faible cytotoxicité observée, y compris pour les conditions limites (1000 ppm toluène, 5 jours) indique que ces conditions d'exposition peuvent être conservées en vue d'étudier la réponse cellulaire des BEAS-2B exposées aux différents effluents.

4. Activation des enzymes de métabolisation des xénobiotiques

Les analyses chimiques effectuées sur les effluents gazeux ont montré que la conversion du toluène n'était pas totale et que des sous-produits étaient formés lors de la réaction catalytique. Suite à ce constat, l'expression de 12 gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques organiques a été mesurée. La figure 38 représente les niveaux d'expression de ces EMX.

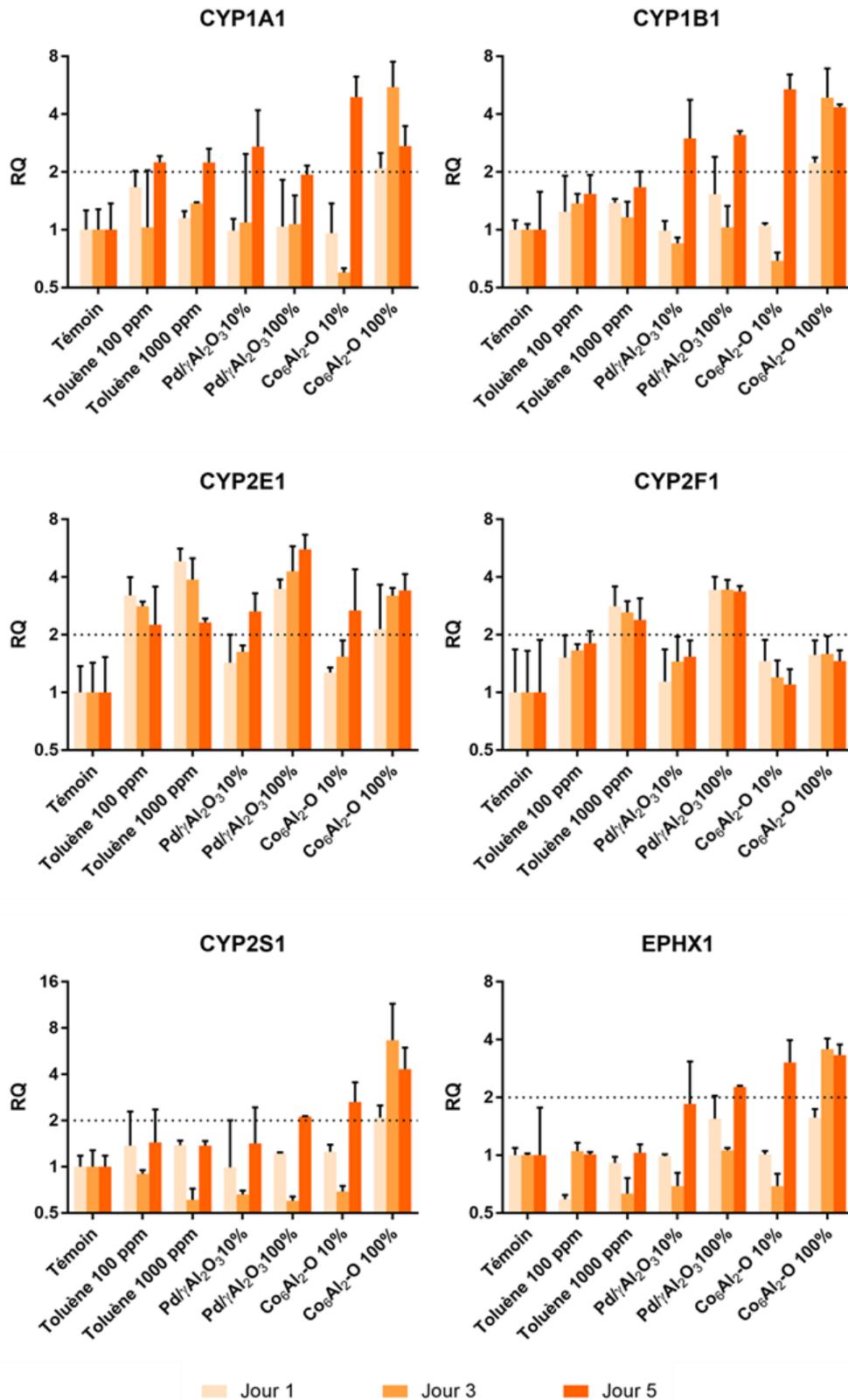


Figure 38 : Expression relative de 12 EMX après exposition des cellules BEAS-2B au toluène (100 et 1000 ppm) ou aux effluents gazeux issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours (effluent non dilué (100 %) ou dilué (10 %) dans l'air filtré). L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significativement différent du témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

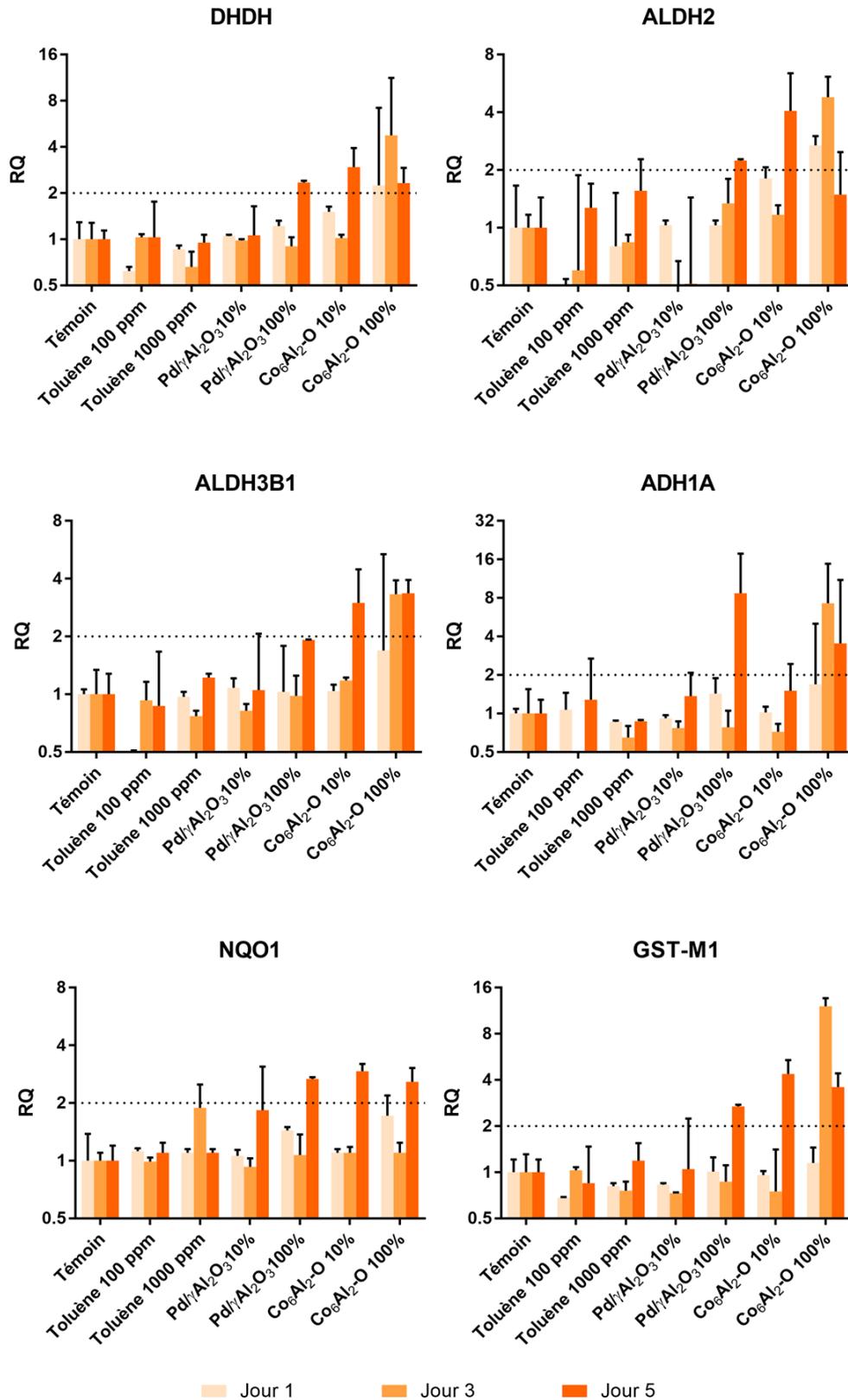


Figure 38 : Expression relative de 12 EMX après exposition des cellules BEAS-2B au toluène (100 et 1000 ppm) ou aux effluents gazeux issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours (effluent non dilué (100 %) ou dilué (10 %) dans l'air filtré. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significativement différent du témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Après exposition au toluène, trois gènes appartenant à la famille des cytochromes P450 (*CYP450*) montrent une surexpression significative : *CYP2E1*, *CYP2F1* et *CYP1A1*. Pour *CYP2E1*, cette augmentation de l'expression est observée pour les cellules exposées aux différentes concentrations de toluène (100 et 1 000 ppm). Toutefois, les valeurs de RQ diminuent entre les jours 1 et 5, passant de 3,2 à 2,2 pour 100 ppm et de 4,8 à 2,3 pour 1 000 ppm de toluène. Une diminution est également observée pour le gène *CYP2F1* entre le jour 1 au jour 5 (RQ = 2,8 et 2,3 respectivement), mais ce dernier n'est surexprimé que pour la concentration en toluène la plus élevée. Enfin, *CYP1A1* est surexprimé uniquement le 5^{ème} jour d'exposition pour les deux concentrations testées.

Dans un deuxième temps, les cellules ont été exposées aux effluents gazeux obtenus après réaction catalytique. En utilisant le catalyseur Pd/ γ -Al₂O₃, l'exposition répétée des cellules à 10 % du flux gazeux produit une augmentation significative de l'expression de *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CYP2E1* (RQ = 2,7, 3,0 et 2,7 respectivement à J5). Le même résultat est observé pour les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* lorsque les cellules sont exposées à 100 % du flux émis. Concernant *CYP2E1*, nos résultats montrent une augmentation dépendante du temps avec des valeurs de RQ supérieures à 4,0 les jours 3 et 5. Les autres gènes testés ne sont surexprimés que pour 100 % du flux sortant. Ainsi, *CYP2F1* est significativement surexprimé du jour 1 au jour 5, avec un RQ de 3,4. Après 5 jours d'exposition les gènes *CYP2S1*, *EPHX1*, *NQO1*, *GSTM1*, *DHDH* et *ALDH2* sont surexprimés avec une valeur de RQ supérieure à 2,0 et *ADH1A* avec un RQ de 8,7.

En utilisant le catalyseur Co₆Al₂-O, l'exposition pendant 5 jours des cellules BEAS-2B à 10 % du flux de provoque la surexpression de tous les EMX testées à l'exception de *CYP2F1* et *ADH1A*. Ainsi, les niveaux d'expression de *CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTM1* et *ALDH2* sont tous supérieurs à 4,0. Après exposition à l'effluent gazeux non dilué (100 %), aucune différence significative dans l'expression de *CYP2F1* n'est observée. Un profil en forme de « U inversé » est obtenu pour l'expression relative de *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2S1*, *GSTM1*, *EPHX1*, *DHDH*, *ADH1A* et *ALDH2*, avec une augmentation significative de l'expression pour le 3^{ème} jour. En revanche, le gène *NQO1* est surexprimé mais avec un profil d'induction en forme de « U ». Enfin, *CYP2E1* est surexprimé significativement du jour 1 au jour 5 avec des RQ de 2,1, 3,2 et 3,4 respectivement tandis que *ALDH3B1* a montré une surexpression à partir du 3^{ème} jour d'exposition, avec une valeur de RQ de 3,3.

En résumé, l'exposition des cellules BEAS-2B aux flux gazeux après oxydation catalytique entraine des différences dans l'expression des gènes codant pour les EMX par rapport aux cellules témoins et aux cellules exposées au toluène (100 et 1 000 ppm). Ces observations suggèrent une influence du toluène non-converti et des sous-produits issus de l'oxydation catalytique du toluène. L'expression des enzymes diffère également entre les deux catalyseurs. En effet, CYP2E1 et CYP2F1 sont plus exprimés lorsque le catalyseur commercial

$Pd/\gamma Al_2O_3$ est utilisé tandis que DHDH, CYP2S1 et ALDH tendent à être davantage exprimés après exposition au flux gazeux obtenu avec le catalyseur Co_3Al_2O .

5. Réponse inflammatoire des cellules BEAS-2B

La réponse inflammatoire des cellules après exposition au toluène ou aux effluents gazeux obtenus après réaction catalytique a été évaluée par la mesure du niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes *IL-6* et *IL-8* (figure 39) et du niveau relatif de sécrétion extracellulaire de leur interleukine respective (figure 40). Contrairement à l'expression génique, les valeurs obtenues lors de la quantification des interleukines sécrétées par les cellules exposées ne sont pas significativement différentes de celles obtenues pour les cellules témoins. Certaines tendances peuvent être toutefois notées.

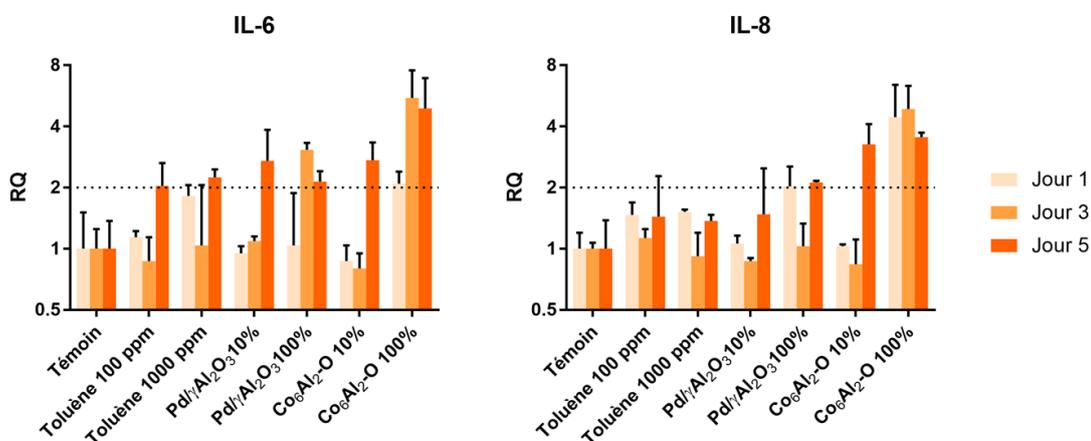


Figure 39 : Expression relative de 2 gènes de l'inflammation (*IL-6* et *IL-8*) après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

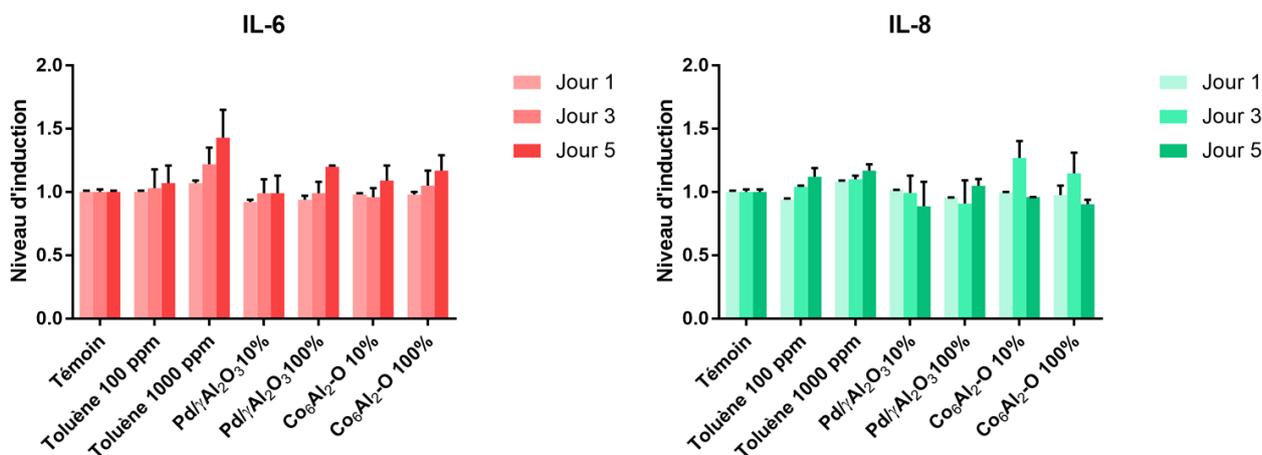


Figure 40 : Mesure de la sécrétion relative des interleukines (*IL-6* et *IL-8*) après exposition des cellules au toluène ou au flux gazeux après oxydation catalytique pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. Les concentrations d'interleukines ont été mesurées par méthode ELISA dans le surnageant de répliques biologiques ($n = 3$) et les valeurs ont été comparées aux cellules exposées à l'air filtré. Aucune différence statistique n'a été observée (test U de Mann Whitney ; $p < 0,05$).

Tout d'abord, l'exposition répétée des cellules BEAS-2B au toluène (100 et 1 000 ppm) entraîne une augmentation significative de l'expression du gène *IL-6* avec des valeurs de RQ supérieures à 2 seulement à J5. Lors des expositions aux effluents gazeux après oxydation catalytique (10 %), une surexpression génique significative est mesurée à J5, avec une valeur de RQ de 2,7 pour les deux catalyseurs. En revanche, un profil en forme de « U inversé » du niveau d'expression d'*IL6* est observé en fonction du temps suite à l'exposition des cellules à l'effluent non dilué (100 %). En effet, le gène est plus exprimé le troisième jour par rapport aux premier et cinquième jours d'exposition. Les valeurs de RQ ne sont significatives que pour J3 et J5, soit respectivement 3,0 et 2,1 pour le catalyseur Pd/ γ Al₂O₃ et 5,5 et 4,9 pour Co₆Al₂-O. Concernant la sécrétion relative d'IL-6, cette dernière semble légèrement augmenter en fonction de la concentration en toluène et du temps d'exposition. L'exposition répétée aux effluents générés avec les deux catalyseurs (10 % et 100 %) semble également augmenter la sécrétion de la cytokine IL-6.

Aucune différence significative de l'expression d'*IL-8* n'est observée après exposition des cellules au toluène ou à 10 % du flux issu de l'oxydation catalytique de Pd/ γ Al₂O₃. Le gène n'est surexprimé qu'à partir du 5^{ème} jour pour 10 % du flux de Co₆Al₂-O, avec une valeur de RQ de 3,2. Par ailleurs, l'exposition à 100 % du flux émis par ce catalyseur provoque un profil d'expression d'*IL-8* en forme de « U inversé » avec une valeur de RQ à J3 de 4,8, tandis que les valeurs de RQ après le premier et le cinquième jour sont respectivement de 4,4 et 3,5. En revanche, un profil en forme de « U » est révélé pour les cellules exposées au flux gazeux en sortie du catalyseur Pd/ γ Al₂O₃ (100 %). En effet, l'expression d'*IL-8* ne montre aucune variation significative à J3 par rapport au témoin tandis que les valeurs de RQ à J1 et J5 sont respectivement de 2,0 et 2,1. Ces deux profils sont également obtenus lors de la mesure du niveau d'expression de l'interleukine pour les mêmes expositions (100 % du flux). Enfin, l'exposition au toluène semble induire une augmentation de la sécrétion d'*IL-8* en fonction du temps tandis qu'une diminution est observée pour 10 % du flux sortant de Pd/ γ Al₂O₃.

La mesure du niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 a mis en évidence leur surexpression dans les cellules exposées aux flux de toluène et aux gaz issus de son oxydation catalytique. Les gènes codant pour les 2 interleukines sont davantage exprimés dans le cas de l'utilisation du catalyseur Co₆Al₂-O, comparativement au catalyseur Pd/ γ Al₂O₃. Des profils d'expression en fonction du temps en forme de « U » et de « U inversé » sont observés après exposition aux différents effluents gazeux après réaction catalytique. La sécrétion des interleukines n'est pas significativement augmentée suite à l'exposition des cellules aux composés gazeux ; seules certaines tendances à la hausse ont été observées en fonction de la dose et des expositions répétées, notamment lors de l'exposition au toluène.

6. Expression des mucines

Les niveaux d'expression des deux gènes codant pour des mucines, MUC1 et MUC5AC, sont représentés sur la figure 41.

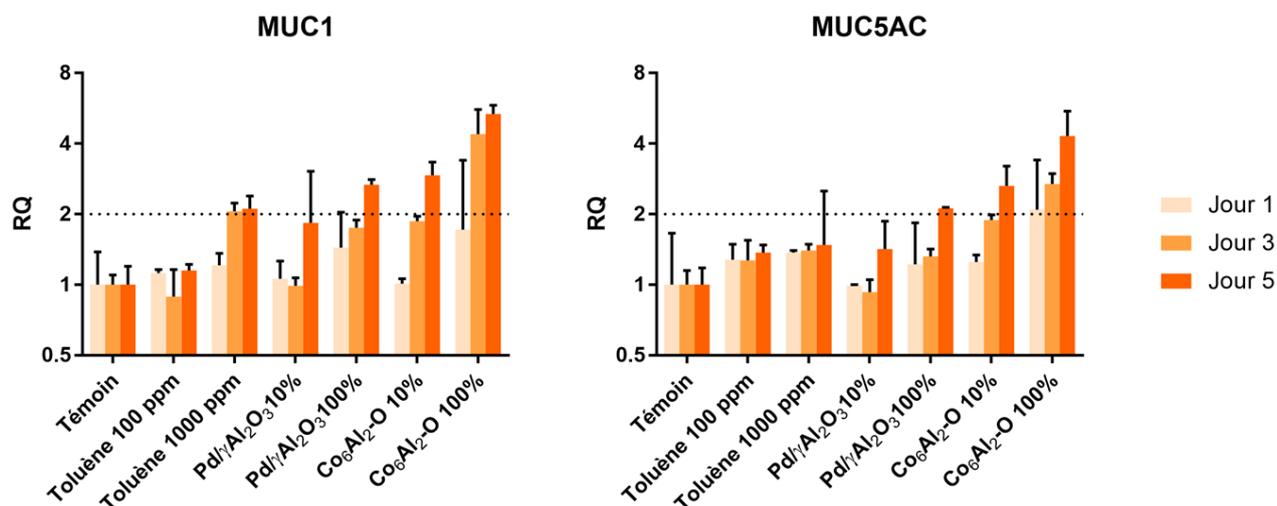


Figure 41 : Expression relative de 2 gènes des mucines (*MUC1* et *MUC5AC*) après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour durant 5 jours. L'expression des gènes a été mesurée par RT-qPCR ($n = 3$) et analysée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation. Le niveau d'expression des gènes est considéré comme significatif par rapport au témoin exposé à l'air filtré pour $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Tout d'abord, les gènes codant pour les protéines du mucus ne sont pas surexprimés dans les cellules BEAS-2B lors de l'exposition aiguë au toluène ou aux effluents gazeux après oxydation du toluène en utilisant Pd/γAl₂O₃ et Co₆Al₂-O, à l'exception de l'exposition des cellules à 100 % de l'effluent correspondant au catalyseur Co₆Al₂-O. Lors des expositions répétées, aucune variation significative n'est observée pour *MUC1* et *MUC5AC* entre les cellules exposées à 100 ppm de toluène et les cellules témoins. En revanche, l'exposition à la concentration en toluène la plus élevée (1 000 ppm) provoque la surexpression de *MUC1*. Son expression est dépendante du temps avec des valeurs de RQ supérieures à 2,0 les jours 3 et 5. Concernant le catalyseur Pd/γAl₂O₃, les gènes *MUC1* et *MUC5AC* ne sont surexprimés que pour 100 % du flux sortant et seulement lors du 5^{ème} jour (RQ = 2,6 et 2,1 respectivement). Enfin, une tendance similaire est observée pour les 2 protéines lorsque les cellules sont exposées de manière répétée à l'effluent gazeux relatif au catalyseur Co₆Al₂-O. A la concentration la plus faible, l'expression de *MUC1* et *MUC5AC* est augmentée significativement le cinquième jour avec des RQ de 2,9 et 2,6, respectivement. Après exposition à 100 % du flux sortant, l'augmentation de l'expression est significative à partir du 3^{ème} jour avec des RQ supérieures à 2 pour *MUC5AC* et supérieures à 4 pour *MUC1*.

L'exposition répétée des cellules permet de mettre en évidence l'expression de deux gènes du mucus, MUC1 et MUC5AC. Alors que MUC1 a été le seul des 2 gènes surexprimés lors de l'exposition au toluène (1 000 ppm), les gènes codant pour les mucines MUC1 et MUC5AC sont surexprimés pour le catalyseur commercial Pd/ γ Al₂O₃ à partir du jour 5 et pour 100 % du flux sortant. En revanche, l'exposition à l'effluent gazeux après oxydation catalytique du toluène en utilisant Co₆Al₂-O a provoqué la surexpression des gènes aux deux concentrations testées et dès le troisième jour pour la concentration la plus élevée.

7. Discussion

L'industrie est aujourd'hui le premier secteur d'activité dans le classement des émissions de COV dans l'atmosphère. Afin de limiter leur impact sur l'environnement, de nombreux industriels sont amenés aujourd'hui à prendre des mesures de réduction de leurs émissions. Les techniques de remédiation recommandées ont essentiellement pour objectif de récupérer ou détruire les composés présents dans des effluents gazeux afin d'éviter leur rejet dans l'atmosphère. L'efficacité de ces méthodes, comme par exemple l'oxydation catalytique, doit être validée avant leur utilisation à l'échelle industrielle. L'efficacité d'un catalyseur d'oxydation totale est évaluée à partir de sa capacité à convertir le ou les composés à éliminer et de sa sélectivité pour former le dioxyde de carbone et l'eau, comme produits de réaction. Toutefois, l'oxydation catalytique d'un composé comme le toluène peut entraîner la formation de sous-produits toxiques, comme par exemple le benzène (Al Zallouha et al., 2017). C'est pourquoi, en complément des analyses chimiques, une évaluation toxicologique du toluène résiduel et de sous-produits de réaction a été effectuée dans le cadre d'un travail collaboratif avec l'équipe TCEP de l'UCEIV.

Le niveau d'expression de 12 gènes intervenant dans le métabolisme des COV a été évalué après exposition répétée des cellules au toluène ou aux effluents gazeux obtenus après réaction en présence des deux catalyseurs testés : Pd/ γ Al₂O₃ et Co₆Al₂-O.

CYP1A1, *CYP2E1* et *CYP2F1* sont les 3 gènes surexprimés suite à l'exposition des cellules BEAS-2B au toluène. *CYP2E1* et *CYP1A1* sont des enzymes connues pour participer à la première étape du métabolisme du toluène. En effet, ces enzymes sont associées à la transformation du toluène en alcool benzylique (Lee and Yang, 2008; Nakajima et al., 1997). Concernant *CYP2F1*, une précédente étude menée au laboratoire a permis également d'observer une surexpression du gène lors de l'exposition de cellules épithéliales alvéolaires A549 à 1 000 ppm de toluène pendant 1 heure (Al Zallouha et al., 2017). Cependant, ces 3 EMX ne sont pas spécifiques d'une exposition au toluène. Ils sont également impliqués dans le métabolisme des HAP pour *CYP1A1* (Savary et al., 2018), et du benzène pour *CYP2E1* (Kim et al., 2015; Pohl and Scinicariello, 2011) et *CYP2F1* (Castell et al., 2005; Sheets et al., 2004).

En exposant les cellules BEAS-2B aux effluents gazeux résultant de l'oxydation du toluène par les deux catalyseurs testés, l'expression de 4 *CYP* a été augmentée significativement. Ainsi, *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CYP2E1* ont été surexprimés dans les deux cas, tandis que l'expression de *CYP2F1* a été significativement augmentée après utilisation du catalyseur commercial Pd/ γ Al₂O₃ et *CYP2S1* pour le catalyseur Co₆Al₂-O. D'après la littérature, l'expression de *CYP2E1* et *CYP2F1* peut-être liée à la présence de toluène non converti et à celle du benzène, qui correspond à un sous-produit de la réaction d'oxydation (Al Zallouha et al., 2017). Ce premier résultat corrobore la présence de toluène pour les 2 catalyseurs et de benzène pour Pd/ γ Al₂O₃, deux composés dont la présence dans les effluents gazeux a été révélée par analyse chimique. En plus de la présence de ces 2 COV, nous pouvons également soupçonner la formation de HAP en tant que sous-produits formés par le catalyseur Co₆Al₂-O. En effet, nous avons constaté une expression plus forte de *CYP1A1* dans les cellules exposées aux effluents suite à l'utilisation de ce catalyseur par rapport à celle observée dans les cellules exposées au toluène non oxydé. *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CYP2S1* peuvent être surexprimés par la présence de HAP et pour cette raison, ils sont parfois utilisés comme biomarqueurs d'exposition (Saarikoski et al., 2005; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004).

L'expression des gènes *NQO1*, *EPHX1* et *GSTM1* a également été testée. Ces gènes codent pour des enzymes qui jouent un rôle dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques comme le benzène (Kim et al., 2007). Ainsi, nous avons observé que ces 3 gènes sont surexprimés significativement après exposition des cellules BEAS-2B aux gaz résultant de l'oxydation catalytique du toluène. En revanche, le niveau d'expression est plus élevé dans le cas de l'utilisation du catalyseur Co₆Al₂-O par rapport à ceux obtenus pour le catalyseur commercial Pd/ γ Al₂O₃. Cette surexpression pourrait être expliquée par la présence d'autres sous-produits en concentrations très faibles dans l'effluent gazeux. En particulier, il est connu que le BaP augmente l'expression de *NQO1* (Rossner et al., 2016) tandis que l'expression de *EPHX1* peut résulter de la présence de butadiène, de styrène ou de HAP (Václavíková et al., 2015). Pour ces raisons, nous ne pouvons pas exclure la formation d'HAP, comme sous-produits de l'oxydation catalytique du toluène.

Pour les expositions aux effluents après oxydation catalytique, nous avons également mesuré une surexpression du gène *DHHDH* (dihydrodiol déshydrogénase). Sa présence peut être liée à la présence de HAP dans les effluents gazeux. En effet, la toxicité des métabolites réactifs des HAP peut intervenir à travers deux voies différentes. Premièrement, la combinaison des enzymes CYP et de l'époxyde hydrolase génère des molécules pouvant interagir avec l'ADN et conduire à la formation d'adduits à l'ADN. Deuxièmement, l'activation de la voie DHHDH induit la formation de l'o-quinone par oxydation du catéchol entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et provoquant ainsi des dommages à l'ADN (Moorthy et al., 2015). Ainsi, comme suggéré après la mesure d'une augmentation de l'expression de *CYP1A1*, *CYP1B1* et

CYP2S1, la surexpression significative de *DHHDH* pourrait-être expliquée par la présence de HAP dans les effluents obtenus après oxydation catalytique.

Une augmentation de l'expression du gène *ADH1A*, appartenant à la famille des alcools déshydrogénases, a été mise en évidence le 5^{ème} jour après exposition des cellules aux effluents obtenus avec le catalyseur Pd/ γ Al₂O₃. *ADH1A* a également été significativement surexprimé à partir du 3^{ème} jour après oxydation du toluène par le catalyseur Co₆Al₂-O. Les enzymes appartenant à la famille des alcools déshydrogénases participent à la phase I du métabolisme des xénobiotiques et ont notamment pour rôle de catalyser la transformation de l'alcool benzylique (INRS, 2012b). D'autres études ont également analysé l'effet des COV sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de la famille des ADH. Toutefois, les résultats obtenus ne sont pas similaires aux nôtres. Bird et al. ont en effet montré une diminution de l'activité des alcools déshydrogénases après exposition de souris pendant 15 jours au benzène ou au toluène, mais aucun changement significatif du niveau d'expression n'a été observé après exposition au mélange des deux COV (Bird et al., 2010). Les alcools déshydrogénases interviennent non seulement dans l'oxydation des alcools en aldéhydes mais aussi dans la réduction de ces derniers en alcools (Edenberg and Bosron, 2010). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'exposition au toluène non converti, au benzène, voire à d'autres sous-produits non détectés par analyse chimique, tels que des composés oxygénés, génère une modification dans l'expression des gènes *ADH*, comme observé dans notre étude.

Pour finir, *ALDH2* et *ALDH3B1* ont également été surexprimés après exposition des BEAS-2B aux deux effluents. Ces enzymes participent au métabolisme du toluène et du benzène. *ALDH2* est la première enzyme impliquée dans l'oxydation de l'acétaldéhyde (Marchitti et al., 2008). En revanche, l'augmentation de l'expression de *ALDH3B1* peut être liée à la présence de différents aldéhydes, tels que le benzaldéhyde, l'hexanal et l'acétaldéhyde (Marchitti et al., 2010). Toutefois, la surexpression de *ALDH2* et *ALDH3B1* causée par la présence de sous-produits formés lors de l'oxydation catalytique du toluène, mais non détectés par les analyses chimiques, ne peut pas être exclue.

Le tableau 16 résume l'expression relative de ces gènes après 1, 3 ou 5 jours d'exposition. Ainsi, l'augmentation significative de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques organiques aromatiques, tels que *CYP2E1*, *CYP2F1* ou *GSTM1* est cohérente avec la présence de toluène non converti et de benzène, identifié par analyse chimique comme étant un sous-produit. Les expositions répétées ont permis de montrer l'expression tardive de *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2S1* et *DHHDH* probablement liée à la formation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques non détectés par les méthodes analytiques classiques utilisées pour l'évaluation des performances de catalyseurs. Les niveaux d'expression des gènes codant pour les enzymes *ALDH2* et *ALDH3B1* tendent à montrer la présence de composés oxygénés

de la famille des aldéhydes, qui correspondraient soit à des composés de métabolisation du toluène et/ou du benzène ou bien à des composés émis lors de la réaction catalytique du toluène. Les HAP et les aldéhydes pourraient donc avoir été émis principalement lors de l'utilisation du catalyseur Co₆Al₂-O tandis que le catalyseur commercial Pd/γAl₂O₃ semble à l'origine de la formation de benzène, comme l'a montré l'analyse chimique (tableau 15).

Enfin, la surexpression tardive des EMX montre l'intérêt des expositions répétées. En effet, lors d'une précédente étude réalisée au sein du laboratoire (Al Zallouha et al., 2017), la toxicité des effluents gazeux générés par le catalyseur Pd/γAl₂O₃ avait été évaluée uniquement lors d'une exposition aiguë de cellules épithéliales alvéolaire A549. Les résultats obtenus étaient similaires aux nôtres puisqu'aucune surexpression significative des EMX (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2E1*, *CYP2S1*, *NQO1* et *EPHX1*) n'avait été mesurée après 1h d'exposition dans les cellules exposées par rapport aux cellules témoins. Toutefois, dans le cadre de la présente étude, la réalisation d'expositions répétées a permis de montrer l'apparition d'une augmentation significative de l'expression de ces mêmes gènes à J3 et J5, qui peut être expliquée par la présence de toluène non converti et la formation du sous-produit benzène après réaction catalytique. Alors que la première étude avait tendance à montrer que le toluène résiduel et le benzène en petites quantités n'avait pas d'effet sur l'expression de ces EMX, nous montrons désormais une surexpression de ces gènes dans le temps, grâce à la réalisation d'expositions répétées.

Tableau 16 : Expression relative des gènes EMX après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux gaz issus de son oxydation catalytique pendant 1 heure/jour pendant 5 jours. L'expression des 12 gènes a été mesurée par RT-qPCR (n = 3) et analysée par la méthode ΔΔC_t (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant des cellules exposées à l'air filtré comme référence et la moyenne géométrique C_t de 18S, GAPDH et B2M comme gènes de normalisation (= : aucune différence significative de l'expression ; - : RQ < 0,5 ; + : RQ > 2 ; ++ : RQ > 4)

Gènes	Toluène 10%			Toluène 100%			Pd/γAl ₂ O ₃ 10%			Pd/γAl ₂ O ₃ 100%			Co ₆ Al ₂ -O 10%			Co ₆ Al ₂ -O 100%		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5
<i>CYP1A1</i>	=	=	+	=	=	+	=	=	+	=	=	=	=	=	++	+	++	+
<i>CYP1B1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	=	++	+	++	++
<i>CYP2S1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	++	++
<i>DHAP</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	+	++	+
<i>CYP2E1</i>	+	+	+	++	+	+	=	=	+	+	++	++	=	=	+	+	+	+
<i>CYP2F1</i>	=	=	=	+	+	+	=	=	=	+	+	+	=	=	=	=	=	=
<i>EPHX1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	+	+
<i>NQO1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	+	=	=	+
<i>GSTM1</i>	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	++	=	++	+
<i>ADH1A</i>	=	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=	++	=	=	=	=	++	+
<i>ALDH2</i>	-	=	=	=	=	=	=	-	=	=	=	+	=	=	++	+	++	=
<i>ALDH3B1</i>	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	=	+	+

HAP (sous-produit envisagé)

Toluène non converti
Benzène formé (sous-produit connu)

Aldéhyde (métabolites des composés toluène/benzène ou sous-produit envisagé)

La réponse inflammatoire des cellules après exposition au toluène (100 ou 1 000 ppm) ou au flux issu de son oxydation catalytique (10 ou 100 %) a été évaluée par mesure de l'expression génique et de l'expression protéique des interleukines 6 et 8. La variation significative des deux gènes après exposition des cellules BEAS-2B peut être reliée à la présence, dans les effluents gazeux après oxydation catalytique par $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$ et $\text{Pd}/\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$, de toluène non converti et des sous-produits identifiés par analyse chimique (benzène et acide acétique) et de ceux potentiellement présents (aldéhydes et HAP), comme suggéré par les résultats d'activation des EMX.

Le toluène et le benzène ont été identifiés dans les effluents gazeux après oxydation catalytique par $\text{Pd}/\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$, avec des gammes de concentrations respectives de 228 à 265 ppb et de 396 à 549 ppb. Nos mesures ont ainsi mis en évidence une augmentation significative de l'expression d'*IL-6* à partir du cinquième jour d'exposition pour 10 % de l'effluent et du troisième jour dans le cas de la plus forte concentration (100 %). En revanche, *IL-8* n'a été surexprimé qu'à J5 pour les deux concentrations testées. L'induction des interleukines provoquée par ces deux hydrocarbures aromatiques a également été évaluée dans le chapitre 3, mais pour des concentrations plus élevées que celles mesurées dans les flux après traitement par $\text{Pd}/\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$. En effet, les cellules BEAS-2B ont été exposées à 20 et 100 ppm de benzène et 20, 100 et 1 000 ppm de toluène. Toutefois, une plus forte expression des gènes a été observée dans les cellules exposées aux effluents après oxydation catalytique en comparaison à celle des cellules exposées au toluène seul. Au vu de ces résultats, nous émettons l'hypothèse que le mélange des deux composés peut-être à l'origine de l'augmentation du pouvoir inflammatoire à J5 par rapport à l'exposition au toluène seul. Des études ont en effet reportées une accentuation des effets lors de l'exposition de cellules pulmonaires en ALI aux deux molécules associées, se traduisant par une augmentation de la mortalité cellulaire et des dommages à l'ADN (Pariselli et al., 2009b). Une hausse de la sécrétion de la chimiokine MCP-1 a également été observée après exposition de cellules A549 à un mélange de 3 hydrocarbures aromatiques (m-xylène, styrène et chlorobenzène) (Fischäder et al., 2008).

Lors de l'utilisation du catalyseur $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$, une surexpression d'*IL-6* et *IL-8* a été mesurée. Dans les mêmes conditions d'exposition, l'augmentation significative de l'expression des enzymes *ALDH2* et *ALDH3B1* permet de suggérer la présence d'aldéhydes, tels que l'acétaldéhyde ou le benzaldéhyde, dans l'effluent gazeux (Marchitti et al., 2008, 2010). Cependant, la surexpression de ces deux gènes peut également être liée à la formation de composés aldéhydes lors du métabolisme du toluène. Les aldéhydes sont connus pour leur pouvoir irritant et leur rôle dans l'apparition de syndromes asthmatiques (Hulin et al., 2010). L'exposition des voies respiratoires à ces composés, majoritairement présents dans les fumées de tabac, a d'ailleurs été corrélée avec l'apparition d'inflammation aiguë et avec la production de cytokines pro-inflammatoires telles que *IL-8* (Van Der Toorn et al., 2018). Une sécrétion extracellulaire des interleukines *IL-6* et *IL-8* a également

été observée lors d'une exposition de cellules A549 à du butanal, propanal et pentanal pendant 48 h (Song et al., 2015). Les HAP, deuxième sous-produits envisagés, peuvent également induire une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et IL-8 par des cellules BEAS-2B (Totlandsdal et al., 2014). Pour finir, la tendance à la production d'IL-8 au troisième jour d'exposition pourrait être liée à la présence d'acide acétique dans le flux de gaz après oxydation catalytique. En effet, une augmentation de la sécrétion d'IL-8 a déjà été observée après exposition de cellules pulmonaires à des acides, tels que l'acide acétique (Okubo et al., 2016) ou l'acide chlorhydrique (Chen et al., 2013).

Concernant l'expression protéique d'IL-6 et IL-8, aucune modification n'a été observée lors de la quantification des deux interleukines sécrétées par les cellules exposées au toluène ou aux effluents issus de son oxydation catalytique et ceux obtenus pour les cellules exposées à l'air filtré. Seule une tendance non significative à l'augmentation a été mesurée pour la sécrétion d'IL-6 au cours du temps dans les cellules exposées aux doses les plus élevées de toluène (1 000 ppm) et des effluents après traitement. Cependant, de nombreuses publications ont également étudié la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par des cellules pulmonaires exposées à des hydrocarbures aromatiques ou à des aldéhydes. Ainsi, l'exposition répétée de cellules épithéliales nasales exposées au formaldéhyde à une concentration de 160 ppb (200 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$), a mis en évidence une augmentation du niveau d'IL-8 (Bardet et al., 2014). En revanche, il n'y a pas eu de modifications significatives du niveau relatif de sécrétion d'IL-6 après exposition des cellules 1h/jour pendant 3 jours. Une sécrétion extracellulaire d'IL-8 a également été observée lors d'une exposition aiguë de cellules A549 à 0,2 ppm de toluène ou de benzène (Pariselli et al., 2006, 2009b). Nos observations diffèrent de celles reportées dans la littérature. Dans ces deux études, les analyses des concentrations extracellulaires des interleukines ont été réalisées 24h après la fin des expositions. Il peut être suggéré que les conditions expérimentales retenues dans notre projet pourraient être à l'origine des résultats obtenus. En effet, comme discuté dans le chapitre 3, l'analyse menée 5 heures après la fin des expositions pourrait se révéler trop courte pour la sécrétion des deux interleukines (Kenney et al., 1994; Nordenhäll et al., 2000).

Une augmentation significative des deux protéines du mucus *MUC1* et *MUC5AC* en fonction de la dose et du temps, a également été observée après exposition des cellules BEAS-2B au toluène ou aux effluents gazeux après réaction catalytique. La surexpression de *MUC1* observée dans les cellules BEAS-2B exposées aux flux issus de l'oxydation catalytique du toluène par Pd/ $\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$ peut être due à l'effet du mélange benzène et toluène ou à la présence de sous-produits non identifiés. En revanche, le même effluent provoque une expression moindre de *MUC5AC* que lors de l'exposition au benzène seul. Ce gène code pour les mucines sécrétées et ces dernières sont souvent présentes dans les expectorations des patients atteints de syndromes asthmatiques ou de BPCO (Voynow et al., 2006).

Comme observé pour les enzymes de l'inflammation, l'expression des deux mucines *MUC1* et *MUC5AC* est la plus importante quand les cellules sont exposées à l'effluent après oxydation catalytique par $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$ et ce dès J3 pour la plus forte concentration. A nouveau, ce profil d'expression peut être expliqué par la présence des sous-produits dans le flux gazeux (Hulin et al., 2010). Tout d'abord, *MUC1* est exprimée dans certaines cellules épithéliales respiratoires. Son rôle dans les processus anti-inflammatoires a été démontré lors de l'exposition de cellules épithéliales du système respiratoire à des virus (Kato et al., 2017). En effet, la présence de virus active le récepteur TNF- α , l'un des premiers récepteurs de l'inflammation. Cette activation permet l'expression du gène *MUC1* pour protéger la cellule et diminuer la sécrétion des interleukines. Ainsi, il peut être suggéré que la surexpression de *MUC1* soit reliée à la présence de composés irritants et inflammatoires, tels que les aldéhydes ou les HAP, dont la présence est supposée dans les effluents gazeux.

Concernant *MUC5AC*, une corrélation peut être faite entre son profil d'expression obtenu suite aux expositions à $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$ et l'expression génique d'*IL-6* et *IL-8*. En effet, une expression significative des deux gènes est observée à J5 pour la plus faible concentration et dès la première journée d'exposition pour 100 % du flux. Ainsi, comme discuté dans le chapitre précédent, l'induction des mucines comme *MUC5AC* par les interleukines *IL-6* et *IL-8* peut être envisagée (Bautista et al., 2009; Chen et al., 2003). Des études ont également révélé l'implication d'aldéhydes et de HAP dans l'expression de *MUC5AC*. Ainsi, une augmentation significative de l'expression de ce gène a été observée lors de l'exposition de cellules primaires HBEC à des flux gazeux d'acroléine et d'acétaldéhyde pendant 28 jours (Haswell et al., 2010). La surexpression de *MUC5AC* peut également être provoquée par l'activation du récepteur AhR dans les cellules épithéliales bronchiques via la production d'ERO, ce qui est cohérent avec la surexpression du gène antioxydant *NQO1* à J5 pour les deux concentrations de flux gazeux testées (Chiba et al., 2011; Meldrum et al., 2016). L'expression de *MUC5AC* pourrait donc être liée à la présence de composés oxydants soit directement dans les flux gazeux, tels que les HAP ou soit issus de la biotransformation de ces derniers dans les cellules exposées. De plus, *CYP1A1* et *CYP1B1*, gènes des principales EMX intervenant dans la phase I du métabolisme des HAP, sont également induits par l'activation de l'AhR (Moorthy et al., 2015). Comme *MUC5AC* et *NQO1*, ces deux gènes ont été surexprimés après exposition des cellules BEAS-2B aux effluents gazeux issus du catalyseur $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$. Ces observations tendent à valider l'hypothèse de la présence de composés organiques polycycliques formés lors de l'oxydation du toluène.

Discussion générale

En 2016, près de 8 000 Gg de composés organiques volatils non méthaniques ont été émis dans l'atmosphère en Europe (EEA, 2019), faisant de ces derniers l'une des 7 familles majoritaires de polluants identifiés par l'Union Européenne (Koolen and Rothenberg, 2019). A cause de leur volatilité à température ambiante, ces composés se retrouvent facilement dans l'atmosphère et peuvent alors avoir un double impact sur la santé. Tout d'abord, certains d'entre eux peuvent causer des réactions allergiques et des irritations mais aussi avoir des effets cancérigènes, mutagènes et/ou reprotoxiques (Laurent and Hauschild, 2014). Par ailleurs, les COV sont des précurseurs de la formation de l'ozone troposphérique (O_3), composé très oxydant qui peut engendrer des irritations des yeux et des voies respiratoires (Seinfeld and Pandis, 2006). Ces polluants peuvent également provoquer des effets néfastes directs et indirects sur l'environnement, et entraîner par exemple, une altération du développement des plantes (Cape, 2003) ou de la microfaune aquatique (Roy et al., 2018).

Avec 48 % des émissions totales, l'industrie est le premier secteur émetteur en COVNM en Europe (EEA, 2019; Koolen and Rothenberg, 2019). Parmi les COVNM majeurs se trouvent les BTEX (pour benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes). Initialement substitut du benzène, le toluène est aujourd'hui l'un des principaux composés aromatiques utilisés comme solvant dans de nombreux procédés industriels tels que la fabrication et l'utilisation de peinture, l'imprimerie ou la cordonnerie. Cependant, de nombreuses enquêtes épidémiologiques ou des études *in vivo* ont mis en évidence sa toxicité sur les voies respiratoires ainsi que sur le système nerveux (INRS, 2012b; Wang and Chen, 1993; Wang et al., 2014; Win-Shwe and Fujimaki, 2010). De plus, ce composé a été classé comme reprotoxique de catégorie 2 par l'Union Européenne (Donald et al., 1991).

Compte tenu de sa nocivité, il semble nécessaire de diminuer les émissions de toluène dans l'atmosphère, que ce soit pour protéger les travailleurs exposés ou la population générale. Pour cela, plusieurs mesures peuvent-être envisagées par les entreprises, avec en premier lieu sa substitution par des composés moins toxiques comme les xylènes et les triméthylbenzènes. En deuxième lieu, des méthodes de remédiation à l'émission de COV dans l'atmosphère, comme le traitement catalytique permettent la conversion totale des COV en composés ayant un impact limité sur la santé, à savoir CO_2 et H_2O . Néanmoins, selon les conditions de réaction, une formation de sous-produits en faible concentration nous incite à évaluer la toxicité des effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique des COV.

Dans ce contexte, la première étape du projet a été de mettre au point les conditions expérimentales d'exposition de cellules épithéliales pulmonaires en interface air-liquide. L'enjeu de cette mise au point était de parvenir à réaliser des expositions répétées, de façon à se rapprocher des conditions d'exposition subaiguë.

Les techniques *in vitro* sont de plus en plus utilisées dans les études d'évaluation de la toxicité des polluants atmosphériques. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques pulmonaires, de nouveaux dispositifs en interface air-liquide ont été développés. Tout d'abord, ce mode de culture permet une mise en condition proche de celle des voies aériennes avec la partie basale des cellules en contact avec un milieu liquide et la partie apicale exposée à une phase gazeuse. De plus, en ce qui concerne l'exposition, les méthodes ALI permettent d'éviter les interactions entre le composé testé et le milieu de culture, et ainsi favoriser la biodisponibilité du composé de manière réelle. En outre, le mode d'exposition ALI permet d'étudier l'impact toxique d'une concentration atmosphérique réelle d'un composé volatil ou gazeux et non une dose diluée en milieu liquide. Les travaux de Ahmad et al. ont mis en évidence des modifications de toxicité du dichlore entre le mode immergé et l'exposition ALI dues à la formation de sous-produits comme l'acide chlorhydrique ou hypochlorique dans le milieu de culture (Ahmad et al., 2014). D'autres travaux ont récemment identifié une diminution de la réponse inflammatoire entre l'exposition à différents aldéhydes (acroléine, crotonaldéhyde et hexanal) en ALI et en mode immergé, liée à la solubilisation des composés dans le milieu de culture, les rendant ainsi inactifs (Dwivedi, 2017). Dans l'étude de Kastner et al., des cellules épithéliales pulmonaires Calu-3 ont été exposées à l'aide d'un système ALI pendant 30 min, 1 h ou 2 h et celles-ci ont présenté une augmentation de la sécrétion d'IL-6 après une exposition à l'air purifié avec un effet temps-réponse démontrant ainsi l'influence de la durée d'exposition (Kastner et al., 2013).

Même si ces premières études *in vitro* en interface air liquide ont produit des résultats intéressants, la plupart d'entre elles ont été réalisées en exposition aiguë et ne permettent donc pas d'estimer les effets d'une exposition répétée. En effet, l'exposition répétée des cellules pulmonaires présente l'intérêt de pouvoir mettre en évidence de nouvelles réponses cellulaires aux xénobiotiques, comme la modification de la morphologie des cellules (Vales et al., 2015), l'altération de l'expression de certains gènes, tels que les gènes codant pour les cytokines et chimiokines (Van Der Toorn et al., 2018) ou de permettre la détection de mécanismes de toxicité tardifs. Actuellement, quelques études ont été réalisées en expositions répétées à des produits chimiques en suspension dans l'air à l'aide de systèmes ALI (Bardet et al., 2014; Gostner et al., 2016). Bardet et al. ont étudié en ALI, les effets de l'exposition de cellules nasales primaires humaines à 160 ppb ($200 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) de formaldéhyde à raison de 1 h/jour pendant 3 jours. Aucune mortalité cellulaire, ni modification de l'intégrité cellulaire n'ont été observées après l'exposition. Une augmentation significative de la production d'IL-8 a été mesurée après trois jours d'exposition, par rapport aux témoins exposés à l'air.

Cette augmentation n'est pas significative pour les cellules exposées pendant seulement une heure au formaldéhyde, montrant ainsi l'effet sur les cellules de l'exposition répétée (Bardet et al., 2014).

Nous avons donc débuté notre projet par une phase de mise au point des conditions de culture et d'exposition en ALI. Pour cela, nous avons tout d'abord sélectionné les cellules BEAS-2B comme modèle cellulaire. Ce type de cellules a été choisi car les bronches sont l'une des premières cibles des substances inhalées qu'il s'agisse de l'air mais aussi des contaminants du compartiment aérien. Selon plusieurs auteurs, la lignée cellulaire BEAS-2B constitue un modèle pertinent pour l'étude toxicologique des polluants atmosphériques en interface air-liquide (Hiemstra et al., 2018; Vales et al., 2015). Ensuite, nous avons exposé les cellules BEAS-2B à l'air filtré grâce au système Vitrocell®. La cytotoxicité mesurée par le test LDH après exposition des cellules était inférieure à 10 % (CE₁₀) jusqu'au jour 5. Nous avons également évalué la prolifération cellulaire par le test AlamarBlue®. Un comportement similaire a été observé avec une diminution de la prolifération cellulaire après le 6^{ème} jour d'exposition. Enfin, l'étude de la morphologie des cellules par microscopie après exposition au flux gazeux d'air filtré et de toluène pendant 5 jours a confirmé l'absence de modifications phénotypiques observables. Ce travail préalable a montré la possibilité de conduire en interface air-liquide des expositions de 1h/jour jusqu'à 5 jours, tout en conservant une viabilité cellulaire permettant la réalisation des expérimentations portant sur l'évaluation des effets des COV.

Dans un second temps, notre projet s'est focalisé sur l'étude de la toxicité des molécules COV pouvant substituer le toluène, comme par exemple le m-xylène et le mésitylène. Une étude sur le benzène, hydrocarbure aromatique modèle et utilisé pendant de nombreuses années dans l'industrie a également été réalisée. Cette série d'expositions a été effectuée en se basant sur les concentrations de la Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) et de la Valeur Limite Court Terme (VLCT) du toluène, soit 20 et 100 ppm, respectivement. Ces valeurs représentent les concentrations dans l'air ambiant de travail à ne pas dépasser sur 8 heures (VLEP) ou 15 minutes (VLCT).

Au niveau européen, le principe de substitution est un élément déterminant du règlement REACH (1907/2006). Ce dernier a pour objectif de mieux connaître la nocivité pour la santé humaine et l'environnement des produits chimiques produits ou importés dans l'UE. Dans le cadre de notre étude, la substitution du toluène par ses homologues supérieurs comme le m-xylène ou le mésitylène doit permettre l'utilisation de composés moins dangereux. Toutefois, la toxicité de ces deux molécules sur les voies respiratoires est peu connue car peu de recherches ont porté sur l'évaluation de leur toxicité chez l'Homme. Nos travaux ont donc eu pour objectif d'évaluer l'effet de l'exposition de cellules épithéliales bronchiques à ces composés. Cette évaluation *in vitro* a été centrée sur l'activation de mécanismes cellulaires comme

l'activation des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, l'apparition d'un processus inflammatoire ou la sécrétion de mucus.

Concernant l'activation des EMX, notre étude a mis en évidence l'activation de différentes voies de métabolisation utilisée par les cellules BEAS-2B pour éliminer les 4 xénobiotiques. Ces observations révèlent l'utilisation d'un mécanisme de protection des cellules contre les 4 COV (Casarett et al., 2001). L'activation des gènes de métabolisation a également été observée lors d'expositions de cellules BEAS-2B en ALI à des aérosols atmosphériques (Lin et al., 2017) ou à des particules provenant d'échappements de moteurs diesel (Grilli et al., 2018).

L'étude de l'initiation d'un processus inflammatoire permet de mettre en évidence des effets irritants qui peuvent s'avérer délétères à long terme puisqu'il s'agit de l'un des premiers symptômes observés lors de l'exposition de l'épithélium pulmonaire (Lee and Yang, 2013). De nombreuses études ont évalué les propriétés inflammatoires des composés chimiques gazeux comme le formaldéhyde (Kastner et al., 2013; Persoz et al., 2012) ou des composés particuliers (Ghio et al., 2013). Dans le cadre de notre étude, la réponse inflammatoire du toluène pourrait être lié aux irritations respiratoires, syndrome souvent évoqué dans les enquêtes épidémiologiques recherchant l'impact sanitaire des COV (Hulin et al., 2010; Rumchev, 2004).

Les hydrocarbures aromatiques étudiés au cours de ce travail sont également connus pour être neurotoxiques et/ou CMR. Par exemple, le toluène a des effets néfastes sur la reproduction (ANSES, 2017a; Plenge-Bönig and Karmaus, 1999). Ainsi, le fait d'avoir étudié uniquement grâce à notre modèle la toxicité sur le système respiratoire en ne considérant que 3 fonctions est l'une des limites de nos travaux. Afin de compléter notre modèle d'étude *in vitro*, il apparaît essentiel de prendre en considération les effets sur d'autres voies. L'évaluation du caractère mutagène ou génotoxique des composés peut être réalisée en mesurant les cassures simples et double brin par le test des comètes (Gminski et al., 2010; Weber et al., 2013), en évaluant la réparation des dommages à l'ADN par quantification de γ H2A.X (Zhang et al., 2019) ou des adduits d'oxydation à l'ADN (Zhang et al., 2017).

Ensuite, notre projet s'est intéressé à l'étude d'une méthode de remédiation à l'émission du toluène à la source. Le traitement catalytique d'un flux de toluène représente l'une des solutions recommandées afin de diminuer les émissions de COV dans l'atmosphère (Berenjian et al., 2012) mais l'utilisation de ces techniques peut générer des effluents gazeux pouvant renfermer des substances toxiques lorsque la réaction ne présente pas une sélectivité totale en CO₂ et H₂O et qu'il se forme des sous-produits. Le couplage du système d'exposition en interface air-liquide avec un dispositif de test catalytique constitue un point original

du projet, mais nous confronte aussi avec une difficulté qu'est l'étude de la toxicité des mélanges, car ces sous-produits issus de l'oxydation catalytique du toluène peuvent être nombreux.

Nous avons donc évalué la toxicité des effluents en complément des analyses chimiques utilisées classiquement pour estimer la performance des catalyseurs. Après exposition des cellules BEAS-2B aux flux gazeux résultant de l'utilisation de deux catalyseurs ($\text{Pd}/\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$ et $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$), l'expression de certaines EMX a été reliée à la présence de toluène non converti et de benzène formé mais a également permis de supposer la présence d'autres sous-produits, tels que les HAP et des composés oxygénés, non détectés par la méthode analytique. Les concentrations en toluène non-converti et en sous-produits mesurées lors de l'analyse chimique, ont montré une diminution de ces dernières entre le premier et le cinquième jour d'exposition. Cette même diminution a été observée concernant les niveaux d'expression des gènes codant pour les EMX. Cette observation est cohérente avec une évolution de l'activité du catalyseur aux premiers temps d'utilisation et qui tend à se stabiliser ensuite (Genty, 2014). Il pourrait donc être recommandé d'effectuer l'évaluation toxicologique des effluents issus de l'oxydation catalytique du toluène sur une période supérieure à 5 jours, afin de se situer dans les conditions les plus stables du régime de fonctionnement du catalyseur. Pour une application en milieu industriel, il faudrait donc laisser un délai de stabilisation du catalyseur avant d'y envoyer les effluents à traiter.

Pour une oxydation catalytique du toluène à l'échelle industrielle, il subsiste également la question du reste de toluène non converti, même si cette part ne représente que 0,01 à 0,03% du toluène à traiter, et celle des sous-produits formés (benzène, composés oxygénés et/ou HAP). Ayant observé une réponse biologique significative des cellules liée à la présence de ces composés dans les effluents après catalyse, il pourrait être recommandé de renforcer l'efficacité globale du procédé de traitement. Dans cette logique, l'un des objectifs du projet Interreg V Depollutair est de proposer le couplage de techniques de traitement des COV adaptées à l'effluent à traiter. Pour y parvenir, l'utilisation de techniques complémentaires placées en série peut être préconisée pour permettre un traitement total des COV sans émission de sous-produits. Dans le contexte du traitement du toluène et au regard des résultats obtenus dans ce travail, il peut être recommandé de placer en aval du catalyseur d'oxydation, un second dispositif capable de piéger le toluène résiduel et les sous-produits formés. En particulier, un procédé d'adsorption pourrait être envisagé. L'effluent gazeux après catalyse serait alors envoyé sur une colonne renfermant un matériau à fort pouvoir adsorbant vis-à-vis des types de COV restant après la réaction catalytique.

L'évaluation de la toxicité de ces mélanges peut permettre de mettre en évidence des phénomènes de synergie telles que l'addition et la potentialisation ou d'antagonisme entre les composés et les voies d'exposition (European Commission, 1997). La présence de plusieurs composés dans le mélange d'exposition

pourrait provoquer des interactions entre les voies de métabolisation et limiter la détoxification de certains composés, notamment ceux présents aux plus faibles concentrations (Kienzler et al., 2016). De nombreux projets européens se focalisent actuellement sur les meilleures méthodes d'évaluation de la toxicité de ces mélanges (Bopp et al., 2018), qu'il s'agisse d'un mélange de plusieurs composés chimiques sur un organe cible ou d'un composé chimique sur plusieurs organes cibles. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la toxicité d'un mélange de composés sur des cellules épithéliales bronchiques. D'autres travaux ont été réalisés sur l'évaluation du caractère toxique de mélanges de formaldéhyde et de dioxyde d'azote (Kastner et al., 2013) ou de toluène et de benzène (Pariselli et al., 2009b) sur des cellules exposées en ALI. Dans le contexte de notre étude, il est particulièrement important d'évaluer cette toxicité sachant que les individus exposés aux COV le sont le plus souvent à un mélange de composés peu concentrés, que ce soit en atmosphère de travail, en air intérieur ou en air ambiant (Delgado-Saborit et al., 2011; Edwards et al., 2001).

Enfin, les résultats que nous avons obtenus en termes d'effets suite à une exposition aux COV grâce à l'utilisation d'une approche *in vitro* en interface air-liquide nous amène à l'extrapolation de ces observations. En effet, le remplacement des méthodes *in vivo* par des méthodes *in vitro* fait partie des recommandations dans la méthodologie 3R. Afin de pouvoir remplacer une méthode, certains critères d'acceptation réglementaire des approches de test des 3R ont été définis et doivent être respectés (EMA, 2016). Par exemple, il est nécessaire de démontrer que la méthode de substitution fournit soit de nouvelles données, soit des données au moins aussi utiles et de préférence meilleures que celles obtenues avec les méthodes existantes. De plus, ces dernières doivent être fiables et robustes. Dans le cadre de notre étude, il est important de définir la pertinence du modèle *in vitro* utilisé, c'est-à-dire la mesure dans laquelle le modèle peut prédire correctement l'effet biologique d'intérêt. Une revue récente a pu mettre en évidence l'intérêt du système d'exposition en interface air-liquide pour l'étude des mécanismes de toxicité pulmonaire (Upadhyay and Palmberg, 2018), mais certains effets de ces toxiques comme notamment les effets neurotoxiques ou CMR ne peuvent pas être évalués. Le développement de nouveaux paramètres pertinents pour l'étude des mécanismes de toxicité des composés inhalables est une étape importante dans la validation des méthodes en ALI (Lacroix et al., 2018). Enfin, un nombre limité de tests permettant le remplacement partiel ou total de l'expérimentation animale n'a pas été validé ou ne l'est que partiellement (Kandárová and Letašiová, 2011). Concernant l'évaluation de la toxicité par inhalation, aucune méthode *in vitro* réglementaire n'est actuellement disponible. De nouvelles recherches sont donc à entreprendre afin de trouver le modèle idéal. Dans cette recherche, il semble également que la modélisation des effets et les prédictions QSAR (Price and Krishnan, 2011; Schindler, 2016) aient un rôle à jouer, le modèle *in vitro* parfait n'existant probablement pas.

Conclusion et perspectives

Le premier objectif du travail de thèse consistait en l'évaluation de l'effet d'une exposition aiguë ou répétée de cellules épithéliales bronchiques humaines à des composés organiques volatils régulièrement mesurés dans les atmosphères de travail. Dans ce projet, le toluène a été choisi comme molécule de référence en se basant sur les résultats de prélèvements effectués en milieu industriel. La toxicité de son homologue inférieur, le benzène et de ses homologues supérieurs, le m-xylène et le mésitylène a également été étudiée. Le deuxième objectif a été, en complément des analyses chimiques, d'évaluer le potentiel toxique d'effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène.

Afin de répondre à ces objectifs, des cellules BEAS-2B ont été exposées aux différents flux gazeux en interface air-liquide, à l'aide du système Vitrocell®. Afin de suivre la cinétique des mécanismes d'action de ces composés, trois temps d'exposition ont été choisis, correspondant à une exposition unique, soit 1 h et à deux expositions répétées, soit 1 h par jour durant 3 ou 5 jours. Lors de l'exposition des cellules aux quatre COV, deux concentrations ont été testées : 20 ppm et 100 ppm, représentant respectivement la Valeur Limite d'Exposition Professionnelle et la Valeur Limite à Court Terme du toluène. Pour l'étude des effluents issus de l'oxydation catalytique du toluène, la lignée cellulaire BEAS-2B a été exposée au toluène non traité (100 et 1 000 ppm) ainsi qu'à deux effluents obtenus après traitement catalytique (100 % et dilué à 10 %) pour un flux d'entrée à 1 000 ppm de toluène.

Toxicité du benzène, du toluène, du xylène et du mésitylène

Nous avons tout d'abord comparé la toxicité du benzène et du toluène ainsi que celle de leurs homologues supérieurs pouvant être utilisés comme substitut dans l'industrie. Tout d'abord, le niveau d'induction des EMX a permis de mettre en évidence différentes voies de métabolisation des xénobiotiques. La première voie identifiée correspond à une étape d'oxydation provoquée par l'induction des CYP450, tels que *CYP2E1*. Ce dernier a été mesuré lors des expositions aux 4 COV. La surexpression de *CYP1A1* après exposition des cellules au toluène ou au mésitylène a révélé l'utilisation d'une voie de biotransformation minoritaire, qui permet de transformer les composés benzéniques en composés phénoliques. Nos travaux ont par ailleurs mis en évidence la voie métabolisation du benzène par *EPHX1*, permettant la formation de 1,2-époxybenzène. Les enzymes de la famille des alcools déshydrogénases, *ADH1A* et des aldéhydes déshydrogénases, *ALDH2* et *ALDH3B1* ont également été exprimés révélant la présence de métabolites issus de la biotransformation au sein des cellules.

Concernant le paramètre inflammatoire, nous avons observé une induction plus importante des marqueurs de l'inflammation lors des expositions répétées au benzène par rapport aux autres hydrocarbures aromatiques. Le benzène est la seule molécule ayant induit la surexpression des deux enzymes *IL-6* et *IL-8*, ainsi que celle de la mucine *MUC5AC*. En revanche, les résultats obtenus pour les 3 autres COV sont différents avec une induction temps-dépendante d'*IL-6* lors des expositions au toluène ou au xylène et une surexpression d'*IL-8* à J3 pour le mésitylène. Les résultats obtenus lors de l'expression génique ont révélé, pour les 4 COV, la mise en place d'un mécanisme de protection cellulaire ainsi que l'initiation d'un processus inflammatoire. Cependant, ces observations ne permettent pas à elles seules de conclure sur une différence de toxicité entre ces composés et sur la possibilité de recommander la substitution du toluène par ces homologues.

Toxicité des effluents gazeux après traitement catalytique du toluène

L'un des points originaux de ce projet est le couplage du système d'exposition en ALI avec un dispositif de test catalytique permettant l'oxydation totale du toluène. Nous avons ainsi évalué la toxicité des effluents en complément des analyses chimiques utilisées pour estimer la performance des catalyseurs. Après exposition répétée des cellules BEAS-2B aux flux gazeux résultant de l'utilisation de deux catalyseurs ($\text{Pd}/\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$ et $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$), l'induction de certains EMX utilisés comme biomarqueurs d'exposition, a été reliée à la présence de toluène non converti et de benzène formé lors de la réaction d'oxydation, mais a également permis de supposer la présence d'autres sous-produits, tels que les HAP et des composés oxygénés, non détectés par la méthode analytique. Le mode d'exposition répétée nous a permis de mettre en évidence la présence de sous-produits, probablement à de très faibles concentrations, en raison de l'expression tardive du gène, comme par exemple *CYP1A1* ou *CYP2S1*, impliqués dans la métabolisation des HAP. L'induction d'enzymes appartenant à la famille des *ALDH* a également été observée. Pour le moment, il n'est pas possible d'interpréter avec certitude cette induction. Cette surexpression pourrait être liée à la présence d'un composé de la famille des aldéhydes dans les effluents gazeux ou bien à la présence de métabolites formés lors de la biotransformation du toluène.

Parallèlement à l'évaluation de l'expression génique, nous avons analysé la réponse inflammatoire des cellules exposées. Nous avons ainsi remarqué une augmentation de l'expression des gènes *IL-6* et *IL-8*, ainsi que des deux gènes codant pour des mucines dans les cellules exposées à l'effluent gazeux produit lors de la réaction catalytique. Cette induction peut être reliée à la présence des différents sous-produits formés (benzène et HAP). Ainsi, cette approche *in vitro* a souligné la pertinence de procéder à une évaluation toxicologique des systèmes catalytiques, en complément des analyses chimiques. Pour finir, notre étude a également montré que des expositions à des mélanges de composés (toluène et benzène) même à très

faibles doses parvenaient à induire des effets toxiques supérieurs à ceux des deux molécules prises séparément. Ainsi, il peut être envisagé lors de l'utilisation en industrie des catalyseurs testés, de coupler ces derniers avec un deuxième dispositif de remédiation, comme par exemple un procédé d'adsorption.

Perspectives

L'utilisation d'une monoculture de cellules épithéliales bronchiques nous a permis d'examiner un aspect de la métabolisation des COV étudiés et d'évaluer l'effet inflammatoire provoqué par l'exposition répétée aux COV et nous a également renseignés sur la réponse biologique après exposition des cellules aux effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène. Cependant certaines limites ont été observées durant nos expérimentations. Plusieurs perspectives de recherche, à court et à plus long termes, s'ouvrent donc à la suite de ce travail afin notamment d'améliorer notre modèle *in vitro*.

Tout d'abord, compte tenu des résultats obtenus pour les marqueurs de l'inflammation *IL-6* et *IL-8*, il serait intéressant d'élargir le panel de paramètres impliqués dans cette voie. Ainsi nous souhaiterions tester *TNF- α* qui est l'une des premières cytokines synthétisées lors des processus inflammatoires aigus et qui pourrait être présente dans nos surnageants récupérés de façon précoce. Il pourrait également être intéressant d'évaluer les niveaux d'expression de *MCP-1*, régulièrement mesuré dans les études de toxicité des COV. La mesure par la méthode ELISA des mucines secrétées permettraient également de compléter nos analyses. En parallèle, l'analyse des protéines fonctionnelles permettraient d'identifier les EMX intervenant dans la métabolisation des 4 COV testés. Enfin, des analyses chimiques supplémentaires pourront être réalisées afin d'élucider la question de la formation d'aldéhydes ou d'autres composés oxygénés lors de l'oxydation du toluène en présence du catalyseur $\text{Co}_6\text{Al}_2\text{-O}$.

Dans notre étude, la durée des expositions était de 1 heure. Afin de se rapprocher des conditions réglementaires, il nous semble intéressant d'effectuer des expositions des cellules aux COV plus longues, pour atteindre 8 heures, qui correspondent à la durée prise en considération dans le calcul de la VLEP. Ces études, réalisées sur les cellules BEAS-2B devront faire l'objet d'une mise au point pour s'assurer de la possibilité d'une exposition pendant 8h, en mode répété.

Il peut également être envisagé d'étudier les effets des COV sur d'autres modèles cellulaires. Dans un premier temps, cette expérimentation pourrait également être réalisée avec des cellules nasales et alvéolaires afin de tester l'impact des composés volatils sur la globalité du système respiratoire. Dans un deuxième temps, l'utilisation de co-cultures formées de cellules épithéliales et de cellules du système immunitaire, comme des macrophages, nous permettrait de mieux modéliser les interactions existantes au

niveau pulmonaire. Enfin, dans le but d'étudier les effets à long terme de ces xénobiotiques sur le système respiratoire, il serait intéressant de réaliser des expositions en ALI avec des cultures organotypiques pour une durée allant jusqu'à 28 jours.

Ensuite, l'évaluation de la transformation métabolique des COV et la mesure de leur pouvoir inflammatoire ne sont pas des paramètres suffisants pour conclure sur la toxicité des molécules. Ainsi, la réalisation d'autres tests toxicologiques s'avère nécessaire. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel CMR grâce à des tests de mutagénicité, comme le test des micronoyaux ou de génotoxicité, comme le test des comètes. Ces études complémentaires nous permettraient de mieux connaître les mécanismes d'action des COV afin d'interpréter et d'anticiper l'impact des COV sur la santé des travailleurs mais également de renseigner sur la possibilité de remplacer ces molécules toxiques par des composés moins nocifs.

Enfin, les résultats obtenus lors de l'exposition des cellules BEAS-2B aux effluents gazeux après oxydation catalytique du toluène ont montré l'importance de s'intéresser aux mélanges de composés. Afin d'évaluer leur toxicité, il serait intéressant de réaliser des mélanges binaires ou plus complexes de COV et d'identifier les voies de métabolisation impactées après exposition des cellules.

Références Bibliographiques

- ADEME (2013). Les composés organiques volatils: réduction des émissions de COV dans l'industrie (Paris: Dunod).
- AFSSET (2008). Évaluation des effets sur la santé et des méthodes de mesure des niveaux d'exposition sur le lieu de travail pour le toluène.
- Ahmad, S., Ahmad, A., Neeves, K.B., Hendry-Hofer, T., Loader, J.E., White, C.W., and Veress, L. (2014). In vitro Cell Culture Model for Toxic Inhaled Chemical Testing. *J. Vis. Exp.* 51539.
- Al Zabadi, H., Ferrari, L., Sari-Minodier, I., Kerautret, M.-A., Tiberghent, A., Paris, C., and Zmirou-Navier, D. (2011). Integrated exposure assessment of sewage workers to genotoxins: an urinary biomarker approach and oxidative stress evaluation. *Environ. Health* 10, 23.
- Al Zallouha, M., Landkocz, Y., Brunet, J., Cousin, R., Genty, E., Courcot, D., Siffert, S., Shirali, P., and Billet, S. (2017). Usefulness of toxicological validation of VOCs catalytic degradation by air-liquid interface exposure system. *Environ. Res.* 152, 328–335.
- Albertsmeyer, A.-C., Kakkassery, V., Spurr-Michaud, S., Beeks, O., and Gipson, I.K. (2010). Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 90, 444–451.
- Alwis, K.U., Blount, B.C., Britt, A.S., Patel, D., and Ashley, D.L. (2012). Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). *Anal. Chim. Acta* 750, 152–160.
- ANSES (2017a). Élaboration de VTR par voie respiratoire pour le toluène (n° 2017-SA-0102).
- ANSES (2017b). Guide d'élaboration de VTR de l'Anses (n° 2017-SA-0016).
- Ashley, D.L., and Prah, J.D. (1997). Time Dependence of Blood Concentrations during and after Exposure to a Mixture of Volatile Organic Compounds. *Arch. Environ. Health Int. J.* 52, 26–33.
- Aufderheide, M. (2005). Direct exposure methods for testing native atmospheres. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 213–226.
- Aufderheide, M. (2008). An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 163–180.
- Baghi, R. (2013). Emissions biogéniques de composés organiques volatils en région méditerranéenne : développement instrumental, mesures et modélisation.
- Bañz, N., Slama, R., Béné, M.-C., Charles, M.-A., Kolopp-Sarda, M.-N., Magnan, A., Thiebaugeorges, O., Faure, G., and Annesi-Maesano, I. (2011). Maternal exposure to air pollution before and during pregnancy related to changes in newborn's cord blood lymphocyte subpopulations. The EDEN study cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* 11, 87.
- Bakand, S., and Hayes, A. (2010). Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61, 76–85.

- Balls, M. (1994). Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab. Anim.* *28*, 193–211.
- Balls, M. (2002). Future Improvements: Replacement In Vitro Methods. *ILAR J.* *43*, S69–S73.
- Bardet, G., Achard, S., Loret, T., Desauziers, V., Momas, I., and Seta, N. (2014). A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. *Toxicol. Lett.* *229*, 144–149.
- Barraud, C., Corbière, C., Pottier, I., Estace, E., Blanchard, K., Logie, C., Lagadu, S., Kéavec, V., Pottier, D., Dionnet, F., et al. (2017). Impact of after-treatment devices and biofuels on diesel exhausts genotoxicity in A549 cells exposed at air-liquid interface. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *45*, 426–433.
- Baudic, A. (2017). Caractérisation expérimentale et statistique des sources de Composés Organiques Volatils (COV) en région Île-de-France.
- Baudic, A., Gros, V., Sauvage, S., Locoge, N., Sanchez, O., Sarda-Estève, R., Kalogridis, C., Petit, J.-E., Bonnaire, N., Baisnée, D., et al. (2016). Seasonal variability and source apportionment of volatile organic compounds (VOCs) in the Paris megacity (France). *Atmospheric Chem. Phys.* *16*, 11961–11989.
- Bautista, M.V., Chen, Y., Ivanova, V.S., Rahimi, M.K., Watson, A.M., and Rose, M.C. (2009). IL-8 Regulates Mucin Gene Expression at the Posttranscriptional Level in Lung Epithelial Cells. *J. Immunol.* *183*, 2159–2166.
- Berenjian, A., Chan, N., and Jafarizadeh Malmiri, H. (2012). VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS REMOVAL METHODS: A REVIEW. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* *8*, 220–229.
- BéruBé, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., Forbes, B., Gaça, M., Gray, A., Hall, I., et al. (2009). In vitro models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern. Lab. Anim. ATLA* *37*, 89–141.
- Billet, S., Landkocz, Y., Martin, P.J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., et al. (2018). Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells. *J. Environ. Sci.* *71*, 168–178.
- Billionnet, C., Gay, E., Kirchner, S., Leynaert, B., and Annesi-Maesano, I. (2011). Quantitative assessments of indoor air pollution and respiratory health in a population-based sample of French dwellings. *Environ. Res.* *111*, 425–434.
- Bird, M.G., Wetmore, B.A., Letinski, D.J., Nicolich, M., Chen, M., Schnatter, A.R., and Whitman, F.T. (2010). Influence of toluene co-exposure on the metabolism and genotoxicity of benzene in mice using continuous and intermittent exposures. *Chem. Biol. Interact.* *184*, 233–239.
- Boeglin, M.L., Wessels, D., and Henshel, D. (2006). An investigation of the relationship between air emissions of volatile organic compounds and the incidence of cancer in Indiana counties. *Environ. Res.* *100*, 242–254.
- Bolden, A.L., Kwiatkowski, C.F., and Colborn, T. (2015). New Look at BTEX: Are Ambient Levels a Problem? *Environ. Sci. Technol.* *49*, 5261–5276.
- Bopp, S.K., Barouki, R., Brack, W., Dalla Costa, S., Dorne, J.-L.C.M., Drakvik, P.E., Faust, M., Karjalainen, T.K., Kephelopoulos, S., van Klaveren, J., et al. (2018). Current EU research activities on combined exposure to multiple chemicals. *Environ. Int.* *120*, 544–562.

- de Bruijne, K., Ebersviller, S., Sexton, K.G., Lake, S., Leith, D., Goodman, R., Jetters, J., Walters, G.W., Doyle-Eisele, M., Woodside, R., et al. (2009). Design and Testing of Electrostatic Aerosol *In Vitro* Exposure System (EAVES): An Alternative Exposure System for Particles. *Inhal. Toxicol.* *21*, 91–101.
- Brunet, J., Genty, E., Landkocz, Y., Zallouha, M.A., Billet, S., Courcot, D., Siffert, S., Thomas, D., De Weireld, G., and Cousin, R. (2015). Identification of by-products issued from the catalytic oxidation of toluene by chemical and biological methods. *Comptes Rendus Chim.* *18*, 1084–1093.
- Cakmak, S., Dales, R.E., Liu, L., Kauri, L.M., Lemieux, C.L., Hebborn, C., and Zhu, J. (2014). Residential exposure to volatile organic compounds and lung function: Results from a population-based cross-sectional survey. *Environ. Pollut.* *194*, 145–151.
- Cape, J.N. (2003). Effects of airborne volatile organic compounds on plants. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* *122*, 145–157.
- Caro, J., and Gallego, M. (2009). Environmental and biological monitoring of volatile organic compounds in the workplace. *Chemosphere* *77*, 426–433.
- Carpenter, C.P., Kinkead, E.R., Geary, D.L., Sullivan, L.J., and King, J.M. (1975). Petroleum hydrocarbon toxicity studies. V. Animal and human response to vapors of mixed xylenes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *33*, 543–558.
- Casarett, L.J., Doull, J., and Klaassen, C.D. (2001). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons - Unit 2 Disposition of toxicants* (New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division).
- Castaño, B.P., Ramírez, V., and Cancelado, J.A. (2019). Controlling Painters' Exposure To Volatile Organic Solvents In The Automotive Sector Of Southern Colombia. *Saf. Health Work* *S2093791118302415*.
- Castell, J.V., Teresa Donato, M., and Gómez-Lechón, M.J. (2005). Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.* *57*, 189–204.
- Cavalleri, A., Gobba, F., Nicali, E., and Fiocchi, V. (2000). Dose-Related Color Vision Impairment in Toluene-Exposed Workers. *Arch. Environ. Health Int. J.* *55*, 399–404.
- Chang, F.-K., Chen, M.-L., Cheng, S.-F., Shih, T.-S., and Mao, I.-F. (2007). Evaluation of dermal absorption and protective effectiveness of respirators for xylene in spray painters. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* *81*, 145–150.
- Chang, S.-J., Chen, C.-J., Lien, C.-H., and Sung, F.-C. (2006). Hearing Loss in Workers Exposed to Toluene and Noise. *Environ. Health Perspect.* *114*, 1283–1286.
- Chen, L.-C., and Lippmann, M. (2015). Inhalation Toxicology Methods: The Generation and Characterization of Exposure Atmospheres and Inhalational Exposures: Inhalation Toxicology Methods. In *Current Protocols in Toxicology*, L.G. Costa, J.C. Davila, D.A. Lawrence, and D.J. Reed, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 24.4.1-24.4.23.
- Chen, M.-L., Chen, S.-H., Guo, B.-R., and Mao, I.-F. (2002). Relationship between environmental exposure to toluene, xylene and ethylbenzene and the expired breath concentrations for gasoline service workers. *J. Environ. Monit. JEM* *4*, 562–566.
- Chen, Q., Huang, Y., Yang, Y., and Qiu, H. (2013). Acid-induced cell injury and death in lung epithelial cells is associated with the activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Med. Rep.* *8*, 565–570.

Chen, Y., Thai, P., Zhao, Y.-H., Ho, Y.-S., DeSouza, M.M., and Wu, R. (2003). Stimulation of Airway Mucin Gene Expression by Interleukin (IL)-17 through IL-6 Paracrine/Autocrine Loop. *J. Biol. Chem.* *278*, 17036–17043.

Chiba, T., Uchi, H., Tsuji, G., Gondo, H., Moroi, Y., and Furue, M. (2011). Arylhydrocarbon receptor (AhR) activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species (ROS) production. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *24*, 133–140.

Cicolella, A. (2008). Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. *Rev. Mal. Respir.* *25*, 155–163.

Ciranni, R., Barale, R., and Adler, I.-D. (1991). Dose-related clastogenic effects induced by benzene in bone marrow cells and in differentiating spermatogonia of Swiss CD1 mice. *Mutagenesis* *6*, 417–421.

CITEPA (2017). Composés Organiques Volatils - COV.

Cometto-Muñiz, J.E., and Cain, W.S. (1995). Relative sensitivity of the ocular trigeminal, nasal trigeminal and olfactory systems to airborne chemicals. *Chem. Senses* *20*, 191–198.

Delfino, R.J., Gong, H., Linn, W.S., Hu, Y., and Pellizzari, E.D. (2003). Respiratory symptoms and peak expiratory flow in children with asthma in relation to volatile organic compounds in exhaled breath and ambient air. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* *13*, 348–363.

Delgado-Saborit, J.M., Aquilina, N.J., Meddings, C., Baker, S., and Harrison, R.M. (2011). Relationship of personal exposure to volatile organic compounds to home, work and fixed site outdoor concentrations. *Sci. Total Environ.* *409*, 478–488.

Di, Y.P., Zhao, J., and Harper, R. (2012). Cigarette Smoke Induces MUC5AC Protein Expression through the Activation of Sp1. *J. Biol. Chem.* *287*, 27948–27958.

Di Veroli, G.Y., Fornari, C., Goldlust, I., Mills, G., Koh, S.B., Bramhall, J.L., Richards, F.M., and Jodrell, D.I. (2015). An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Sci. Rep.* *5*, 14701.

Dick, F.D. (2006). Solvent neurotoxicity. *Occup. Environ. Med.* *63*, 221–226.

Diez, U., Kroessner, T., Rehwagen, M., Richter, M., Wetzig, H., Schulz, R., Borte, M., Metzner, G., Krumbiegel, P., and Herbarth, O. (2000). Effects of indoor painting and smoking on airway symptoms in atopy risk children in the first year of life results of the LARS-study. Leipzig Allergy High-Risk Children Study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *203*, 23–28.

Ding, Y.S., Blount, B.C., Valentin-Blasini, L., Applewhite, H.S., Xia, Y., Watson, C.H., and Ashley, D.L. (2009). Simultaneous Determination of Six Mercapturic Acid Metabolites of Volatile Organic Compounds in Human Urine. *Chem. Res. Toxicol.* *22*, 1018–1025.

Dodmane, P.R., Arnold, L.L., Kakiuchi-Kiyota, S., Qiu, F., Liu, X., Rennard, S.I., and Cohen, S.M. (2013). Cytotoxicity and gene expression changes induced by inorganic and organic trivalent arsenicals in human cells. *Toxicology* *312*, 18–29.

Doke, S.K., and Dhawale, S.C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm. J.* *23*, 223–229.

Donald, J.M., Hooper, K., and Hopenhayn-Rich, C. (1991). Reproductive and developmental toxicity of toluene: a review. *Environ. Health Perspect.* *94*, 237–244.

- DREAL Hauts-de-France (2016). L'environnement en Hauts-de-France - L'industrie au regard de l'environnement.
- Dwivedi, A.M. (2017). Experimental studies on acute health effects of acrolein and other aldehydes.
- Eastmond, D. (1987). An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *91*, 85–95.
- Echeverria, D., Fine, L., Langolf, G., Schork, T., and Sampaio, C. (1991). Acute behavioural comparisons of toluene and ethanol in human subjects. *Occup. Environ. Med.* *48*, 750–761.
- Edenberg, H.J., and Bosron, W.F. (2010). Alcohol Dehydrogenases. In *Comprehensive Toxicology*, (Elsevier), pp. 111–130.
- Edwards, R.D., Jurvelin, J., Saarela, K., and Jantunen, M. (2001). VOC concentrations measured in personal samples and residential indoor, outdoor and workplace microenvironments in EXPOLIS-Helsinki, Finland. *Atmos. Environ.* *35*, 4531–4543.
- EEA (2016). Air quality in Europe - 2016 report.
- EEA (2018). Air quality in Europe - 2018 report.
- EEA (2019). Air pollutant emissions data viewer 1999-2016.
- EMA (2016). Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches.
- EPA (2005). Toxicological Review of Toluene. EPA *EPA/635/R-05/004*.
- Ernstgard, L., Löf, A., Wieslander, G., Norbäck, D., and Johanson, G. (2007). Acute Effects of Some Volatile Organic Compounds Emitted From Water-Based Paints. *J. Occup. Environ. Med.* *49*, 880–889.
- Estevan, C., Ferri, F., Sogorb, M.A., and Vilanova, E. (2012). Characterization and Evolution of Exposure to Volatile Organic Compounds in the Spanish Shoemaking Industry over a 5-Year Period. *J. Occup. Environ. Hyg.* *9*, 653–662.
- European Commission (1997). Total volatile organic compounds (TVOC) in indoor air quality investigations (Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities).
- Evans, C.M., Kim, K., Tuvim, M.J., and Dickey, B.F. (2009). Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects: *Curr. Opin. Pulm. Med.* *15*, 4–11.
- Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2233–2247.
- Feldman, A.T., and Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In *Histopathology*, C.E. Day, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 31–43.
- Fischäder, G., Röder-Stolinski, C., Wichmann, G., Nieber, K., and Lehmann, I. (2008). Release of MCP-1 and IL-8 from lung epithelial cells exposed to volatile organic compounds. *Toxicol. In Vitro* *22*, 359–366.
- Fishbein, L. (1985). An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. III. Xylene. *Sci. Total Environ.* *43*, 165–183.

- Fizeşan, I., Chary, A., Cambier, S., Moschini, E., Serchi, T., Nelissen, I., Kiss, B., Pop, A., Loghin, F., and Gutleb, A.C. (2018). Responsiveness assessment of a 3D tetra-culture alveolar model exposed to diesel exhaust particulate matter. *Toxicol. In Vitro* *53*, 67–79.
- Flecknell, P.A. (1994). Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. *Lab. Anim.* *28*, 222–231.
- Fredrick, K., and Ibba, M. (2009). Protein synthesis. *Nature* *457*, 157–158.
- Fulcher, M.L., and Randell, S.H. (2012). Human Nasal and Tracheo-Bronchial Respiratory Epithelial Cell Culture. In *Epithelial Cell Culture Protocols*, S.H. Randell, and M.L. Fulcher, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 109–121.
- Gałęzowska, G., Chraniuk, M., and Wolska, L. (2016). In vitro assays as a tool for determination of VOCs toxic effect on respiratory system: A critical review. *TrAC Trends Anal. Chem.* *77*, 14–22.
- Garrett, M.H., Hooper, M.A., Hooper, B.M., Rayment, P.R., and Abramson, M.J. (1999). Increased risk of allergy in children due to formaldehyde exposure in homes. *Allergy* *54*, 330–337.
- Gaskell, M., McLuckie, K.I.E., and Farmer, P.B. (2004). Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone in the supF forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *554*, 387–398.
- Genty, E., Brunet, J., Poupin, C., Casale, S., Capelle, S., Massiani, P., Siffert, S., and Cousin, R. (2015). Co-Al Mixed Oxides Prepared via LDH Route Using Microwaves or Ultrasound: Application for Catalytic Toluene Total Oxidation. *Catalysts* *5*, 851–867.
- Ghio, A.J., Dailey, L.A., Soukup, J.M., Stonehuerner, J., Richards, J.H., and Devlin, R.B. (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. Part. *Fibre Toxicol.* *10*, 25.
- Gillis, B., Gavin, I.M., Arbieva, Z., King, S.T., Jayaraman, S., and Prabhakar, B.S. (2007). Identification of human cell responses to benzene and benzene metabolites. *Genomics* *90*, 324–333.
- Gminski, R., Tang, T., and Mersch-Sundermann, V. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicol. Lett.* *196*, 33–41.
- Gokhale, S., Kohajda, T., and Schlink, U. (2008). Source apportionment of human personal exposure to volatile organic compounds in homes, offices and outdoors by chemical mass balance and genetic algorithm receptor models. *Sci. Total Environ.* *407*, 122–138.
- Gosepath, J., Grebneva, N., Brieger, J., and Mann, W.J. (2003). Evaluation of Inflammatory Reactions and Genotoxic Effects after Exposure of Nasal Respiratory Epithelia to Benzene. *ORL* *65*, 348–352.
- Gostner, J.M., Zeisler, J., Alam, M.T., Gruber, P., Fuchs, D., Becker, K., Neubert, K., Kleinhapfl, M., Martini, S., and Überall, F. (2016). Cellular reactions to long-term volatile organic compound (VOC) exposures. *Sci. Rep.* *6*.
- Grilli, A., Bengalli, R., Longhin, E., Capasso, L., Proverbio, M.C., Forcato, M., Bicciato, S., Gualtieri, M., Battaglia, C., and Camatini, M. (2018). Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genomics* *19*, 302.

Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.M.A., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., et al. (2006). Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin.* 64, 535–548.

Harrison, R.M. (2002). Personal exposure monitoring of particulate matter, nitrogen dioxide, and carbon monoxide, including susceptible groups. *Occup. Environ. Med.* 59, 671–679.

Haswell, L.E., Hewitt, K., Thorne, D., Richter, A., and Gaça, M.D. (2010). Cigarette smoke total particulate matter increases mucous secreting cell numbers in vitro: A potential model of goblet cell hyperplasia. *Toxicol. In Vitro* 24, 981–987.

Hiemstra, P.S., McCray, P.B., and Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur. Respir. J.* 45, 1150–1162.

Hiemstra, P.S., Grootaers, G., van der Does, A.M., Krul, C.A.M., and Kooter, I.M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol. In Vitro* 47, 137–146.

Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 72, 847–855.

Hudák, A., and Ungváry, G. (1978). Embryotoxic effects of benzene and its methyl derivatives: toluene, xylene. *Toxicology* 11, 55–63.

Hukkanen, J., Lassila, A., Päivärinta, K., Valanne, S., Sarpo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O., and Raunio, H. (2000). Induction and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450s in the Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 360–366.

Hulin, M., Caillaud, D., and Annesi-Maesano, I. (2010). Indoor air pollution and childhood asthma: variations between urban and rural areas. *Indoor Air* 20, 502–514.

INRS (1999). Essences spéciales (FT 96) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2004). Mésitylène (FT 223) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2009a). Les alcools (ED 4425). - Fiche solvants- INRS.

INRS (2009b). Les cétones (ED 4221) - Fiche solvants- INRS.

INRS (2009c). Xylène (FT 77) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2011a). Les solvants pétroliers (ED 4224) - Fiche solvants- INRS.

INRS (2011b). Acide acétique (FT 24) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2011c). Aldéhyde formique et solutions aqueuses (FT 7) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2011d). Benzène (FT 49) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2012a). A propos des fiches toxicologiques (FT 0) - Fiche toxicologique - INRS.

INRS (2012b). Toluène (FT 74) - Fiche toxicologique - INRS.

INSERM (2001). Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles (Paris: Inserm).

INSERM (2013). Pesticides : Effets sur la santé.

Ishii, H., Hayashi, S., Hogg, J.C., Fujii, T., Goto, Y., Sakamoto, N., Mukae, H., Vincent, R., and van Eeden, S.F. (2005). Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respir. Res.* 6, 87.

Jana, S., and Paliwal, J. (2007). Molecular mechanisms of cytochrome p450 induction: potential for drug-drug interactions. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8, 619–628.

Janasik, B., Jakubowski, M., and Jałowicki, P. (2008). Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylene) in urine as result of experimental human volunteer exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81, 443–449.

Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 154, 103–116.

Kandárová, H., and Letašiová, S. (2011). Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip. Toxicol.* 4.

Karlgren, M., Miura, S., and Ingelmansundberg, M. (2005). Novel extrahepatic cytochrome P450s. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 57–61.

Kastner, P.E., Le Calvé, S., Zheng, W., Casset, A., and Pons, F. (2013). A dynamic system for single and repeated exposure of airway epithelial cells to gaseous pollutants. *Toxicol. In Vitro* 27, 632–640.

Kato, K., Lillehoj, E.P., Lu, W., and Kim, K.C. (2017). MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. *J. Clin. Med.* 6, 110.

Kennedy, T., Ghio, A.J., Reed, W., Samet, J., Zagorski, J., Quay, J., Carter, J., Dailey, L., Hoidal, J.R., and Devlin, R.B. (1998). Copper-dependent Inflammation and Nuclear Factor- κ B Activation by Particulate Air Pollution. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 366–378.

Kenney, J.S., Baker, C., Welch, M.R., and Altman, L.C. (1994). Synthesis of interleukin-1 alpha, interleukin-6, and interleukin-8 by cultured human nasal epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93, 1060–1067.

Khan, F.I., and Ghoshal, A. (2000). Removal of Volatile Organic Compounds from polluted air. *J. Loss Prev. Process Ind.* 13, 527–545.

Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., and Worth, A. (2016). Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80, 321–334.

Kilburn, K.H., Seidman, B.C., and Warshaw, R. (1985). Neurobehavioral and respiratory symptoms of formaldehyde and xylene exposure in histology technicians. *Arch. Environ. Health* 40, 229–233.

Kim, K.-N., Lee, H., Kim, J.H., Jung, K., Lim, Y.-H., and Hong, Y.-C. (2015). Physical Activity- and Alcohol-dependent Association Between Air Pollution Exposure and Elevated Liver Enzyme Levels: An Elderly Panel Study. *J. Prev. Med. Public Health Yebang Ŭihakhoe Chi* 48, 151–169.

Kim, S., Lan, Q., Waidyanatha, S., Chanock, S., Johnson, B.A., Vermeulen, R., Smith, M.T., Zhang, L., Li, G., Shen, M., et al. (2007). Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide Range of air concentrations: *Pharmacogenet. Genomics* 17, 789–801.

- Kim, S.Y., Hong, J.Y., Yu, S.-Y., Kim, G.W., Ahn, J.J., Kim, Y., Son, S.W., Park, J.-T., and Hwang, S.Y. (2016). Identification of potential biomarkers for xylene exposure by microarray analyses of gene expression and methylation. *Mol. Cell. Toxicol.* *12*, 15–20.
- Kim, Y.M., Harrad, S., and Harrison, R.M. (2001). Concentrations and sources of VOCs in urban domestic and public microenvironments. *Environ. Sci. Technol.* *35*, 997–1004.
- Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* *258*, 593–597.
- Kobald, S.O., Wascher, E., Blaszkewicz, M., Golka, K., and van Thriel, C. (2015). Neurobehavioral and neurophysiological effects after acute exposure to a single peak of 200 ppm toluene in healthy volunteers. *NeuroToxicology* *48*, 50–59.
- Koda, M., Iwasaki, M., Yamano, Y., Lu, X., and Katoh, T. (2017). Association between NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 genotypes, heterocyclic aromatic amines, and prostate cancer risk: a case control study in Japan. *Environ. Health Prev. Med.* *22*, 72.
- Koolen, C.D., and Rothenberg, G. (2019). Air Pollution in Europe. *ChemSusChem* *12*, 164–172.
- Kooter, I.M., Gröllers-Mulderij, M., Steenhof, M., Duistermaat, E., van Acker, F.A.A., Staal, Y.C.M., Tromp, P.C., Schoen, E., Kuper, C.F., and van Someren, E. (2016). Cellular Effects in an *In Vitro* Human 3D Cellular Airway Model and A549/BEAS-2B *In Vitro* Cell Cultures Following Air Exposure to Cerium Oxide Particles at an Air–Liquid Interface. *Appl. Vitro Toxicol.* *2*, 56–66.
- Korsak, Z., Swiercz, R., and Rydzynski, K. (1995). Toxic effects of acute inhalation exposure to 1,2,4-trimethylbenzene (pseudocumene) in experimental animals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* *8*, 331–337.
- Kwon, J.-W., Park, H.-W., Kim, W.J., Kim, M.-G., and Lee, S.-J. (2018). Exposure to volatile organic compounds and airway inflammation. *Environ. Health* *17*, 65.
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A.C., Larsen, S.T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., et al. (2018). Air–Liquid Interface *In Vitro* Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Appl. Vitro Toxicol.* *4*, 91–106.
- Lakshmanan, I., Ponnusamy, M.P., Macha, M.A., Haridas, D., Majhi, P.D., Kaur, S., Jain, M., Batra, S.K., and Ganti, A.K. (2015). Mucins in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Implications. *J. Thorac. Oncol.* *10*, 19–27.
- Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R.S., Dosemeci, M., Rappaport, S.M., Shen, M., Alter, B.P., Wu, Y., et al. (2004). Hematotoxicity in Workers Exposed to Low Levels of Benzene. *Science* *306*, 1774–1776.
- Lau, A., Belanger, C.L., and Winn, L.M. (2009). In utero and acute exposure to benzene: Investigation of DNA double-strand breaks and DNA recombination in mice. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *676*, 74–82.
- Laurent, A., and Hauschild, M.Z. (2014). Impacts of NMVOC emissions on human health in European countries for 2000–2010: Use of sector-specific substance profiles. *Atmos. Environ.* *85*, 247–255.
- Le Cloirec, P. (2004). COV (composés organiques volatils). *Tech. Ing. G1835*.
- Lee, H.-S., and Yang, M. (2008). Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ. Health Prev. Med.* *13*, 84–93.

- Lee, I.-T., and Yang, C.-M. (2013). Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–12.
- Lee, C.-M., Chen, S.-Y., Lee, Y.-C.G., Huang, C.-Y.F., and Chen, Y.-M.A. (2006). Benzo[a]pyrene and glycine N-methyltransferase Interactions: Gene expression profiles of the liver detoxification pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 126–135.
- Lehmann, I., Röder-Stolinski, C., Nieber, K., and Fischäder, G. (2008). In vitro models for the assessment of inflammatory and immuno-modulatory effects of the volatile organic compound chlorobenzene. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 185–193.
- Lenz, A., Karg, E., Lentner, B., Dittrich, V., Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Schulz, H., Ferron, G.A., and Schmid, O. (2009). A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 6, 32.
- Lin, Y.-H., Arashiro, M., Clapp, P.W., Cui, T., Sexton, K.G., Vizuete, W., Gold, A., Jaspers, I., Fry, R.C., and Surratt, J.D. (2017). Gene Expression Profiling in Human Lung Cells Exposed to Isoprene-Derived Secondary Organic Aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8166–8175.
- Liu, F.F., Peng, C., Escher, B.I., Fantino, E., Giles, C., Were, S., Duffy, L., and Ng, J.C. (2013). Hanging drop: An in vitro air toxic exposure model using human lung cells in 2D and 3D structures. *J. Hazard. Mater.* 261, 701–710.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lomax, R.B., Ridgway, P., and Meldrum, M. (2004). Does occupational exposure to organic solvents affect colour discrimination? *Toxicol. Rev.* 23, 91–121.
- Longhin, E., Holme, J.A., Gualtieri, M., Camatini, M., and Øvrevik, J. (2018). Milan winter fine particulate matter (wPM_{2.5}) induces IL-6 and IL-8 synthesis in human bronchial BEAS-2B cells, but specifically impairs IL-8 release. *Toxicol. In Vitro* 52, 365–373.
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., et al. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* 14, 1262–1263.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., et al. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part. Fibre Toxicol.* 13.
- Loxham, M., Davies, D.E., and Blume, C. (2014). Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clin. Exp. Allergy* 44, 1299–1313.
- Ma, Q. (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr. Drug Metab.* 2, 149–164.
- Maguin, K., Lataye, R., Campo, P., Cossec, B., Burgart, M., and Waniusiow, D. (2006). Ototoxicity of the three xylene isomers in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 648–656.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., and Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 697–720.

- Marchitti, S.A., Brocker, C., Orlicky, D.J., and Vasiliou, V. (2010). Molecular characterization, expression analysis, and role of ALDH3B1 in the cellular protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 1432–1443.
- Mascelloni, M., Delgado-Saborit, J.M., Hodges, N.J., and Harrison, R.M. (2015). Study of gaseous benzene effects upon A549 lung epithelial cells using a novel exposure system. *Toxicol. Lett.* *237*, 38–45.
- McGwin, G., Lienert, J., and Kennedy, J.I. (2010). Formaldehyde Exposure and Asthma in Children: A Systematic Review. *Environ. Health Perspect.* *118*, 313–317.
- Méausoone, C., El Khawaja, R., Tremolet, G., Siffert, S., Cousin, R., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., and Landkocz, Y. (2019). In vitro toxicological evaluation of emissions from catalytic oxidation removal of industrial VOCs by air/liquid interface (ALI) exposure system in repeated mode. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *58*, 110–117.
- Meldrum, K., Gant, T.W., Macchiarulo, S., and Leonard, M.O. (2016). Bronchial epithelial innate and adaptive immunity signals are induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Res.* *5*, 816–827.
- Melnick, R.L. (2006). Carcinogenicity and Mechanistic Insights on the Behavior of Epoxides and Epoxide-Forming Chemicals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *982*, 177–189.
- Meulenbergh, C.J.W., and Vijverberg, H.P.M. (2000). Empirical Relations Predicting Human and Rat Tissue:Air Partition Coefficients of Volatile Organic Compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *165*, 206–216.
- Molhave, L., Clausen, G., Berglund, B., Ceaurriz, J., Kettrup, A., Lindvall, T., Maroni, M., Pickering, A.C., Risse, U., Rothweiler, H., et al. (1997). Total Volatile Organic Compounds (TVOC) in Indoor Air Quality Investigations*. *Indoor Air* *7*, 225–240.
- Moorthy, B., Chu, C., and Carlin, D.J. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicol. Sci.* *145*, 5–15.
- Nakajima, T., and Wang, R.-S. (1994). Induction of cytochrome P450 by toluene. *Int. J. Biochem.* *26*, 1333–1340.
- Nakajima, T., Wang, R.S., Elovaara, E., Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., Raunio, H., Pelkonen, O., Vainio, H., and Aoyama, T. (1997). Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* *53*, 271–277.
- Nett, R.J., Edwards, N.T., Ruder, A.M., Bertke, S.J., Keumala, I., Cox-Ganser, J., and Cummings, K.J. (2017). Deaths from Nonmalignant Respiratory Disease in Styrene-Exposed Workers: Does Obliterative Bronchiolitis Contribute to Mortality? *Ann. Am. Thorac. Soc.* *14*, 810–811.
- Noah, T.L., Yankaskas, J.R., Carson, J.L., Gambling, T.M., Cazares, L.H., McKinnon, K.P., and Devlin, R.B. (1995). Tight junctions and mucin mRNA in BEAS-2B cells. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* *31*, 738–740.
- Nordenhäll, C., Pourazar, J., Blomberg, A., Levin, J.O., Sandström, T., and Adelroth, E. (2000). Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur. Respir. J.* *15*, 1046–1051.
- Nurmatov, U.B., Tagiyeva, N., Semple, S., Devereux, G., and Sheikh, A. (2015). Volatile organic compounds and risk of asthma and allergy: a systematic review. *Eur. Respir. Rev.* *24*, 92–101.
- OECD (2018). Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study (OECD).

Okubo, T., Suzuki, T., Hosaka, M., and Nakae, D. (2016). Effects Induced by Organic Acids in a Human Lung Alveolar Carcinoma Cell Line A549. *YAKUGAKU ZASSHI* 136, 1433–1438.

de Oliveira, R.M., Figueiredo, C.V.B., Santiago, R.P., Yahouédéhou, S.C.M.A., Carvalho, S.P., da Paz, S.S., Fiuza, L.M., de Miranda, F.N., da Guarda, C.C., Fonseca, C.A., et al. (2018). Genetic Polymorphisms Associated with Environmental Exposure to Polycyclic Derivatives in African Children. *Dis. Markers* 2018, 1–9.

ORS IDF (2007). Les composés Organiques volatils (COV) – Etat des lieux: définition, sources d'émissions, exposition, effets sur la santé.

Pariselli, F., Sacco, M.G., and Rembges, D. (2006). Set-up of a dynamic in vitro exposure device for the study of indoor air pollutant effects on human derived cells. In *Environmental Toxicology*, (Mykonos, Greece: WIT Press), pp. 231–239.

Pariselli, F., Sacco, M.G., and Rembges, D. (2009a). An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 33–39.

Pariselli, F., Sacco, M.G., Ponti, J., and Rembges, D. (2009b). Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 381–386.

Persoz, C., Achard, S., Momas, I., and Seta, N. (2012). Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicol. Lett.* 211, 159–163.

Plenge-Bönig, A., and Karmaus, W. (1999). Exposure to toluene in the printing industry is associated with subfecundity in women but not in men. *Occup. Environ. Med.* 56, 443–448.

Podder, B., Song, K.S., Song, H.-Y., and Kim, Y.-S. (2014). Cytoprotective Effect of Kaempferol on Paraquat-Exposed BEAS-2B Cells via Modulating Expression of MUC5AC. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1486–1494.

Pohl, H.R., and Scinicariello, F. (2011). The impact of CYP2E1 genetic variability on risk assessment of VOC mixtures. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 59, 364–374.

Porchet, N., and Aubert, J.-P. (2004). Les gènes: MUC Mucin or not mucin? That is the question. *Médecine/Sciences* 20, 569–574.

Poulin, P., and Krishnan, K. (1996). A Tissue Composition-Based Algorithm for Predicting Tissue:Air Partition Coefficients of Organic Chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136, 126–130.

Price, K., and Krishnan, K. (2011). An integrated QSAR–PBPK modelling approach for predicting the inhalation toxicokinetics of mixtures of volatile organic chemicals in the rat. *SAR QSAR Environ. Res.* 22, 107–128.

Purcell, K.J., Cason, G.H., Gargas, M.L., Andersen, M.E., and Travis, C.C. (1990). In vivo metabolic interactions of benzene and toluene. *Toxicol. Lett.* 52, 141–152.

Rahman, I., and MacNee, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16, 534–554.

Rasmussen, R.E. (1984). In vitro systems for exposure of lung cells to NO₂ and O₃. *J. Toxicol. Environ. Health* 13, 397–411.

Riihimäki, V., and Savolainen, K. (1980). Human exposure to m-xylene, kinetics and acute effects on the central nervous system. *Ann. Occup. Hyg.*

- Roda, C., Kousignian, I., Guihenneuc-Jouyaux, C., Dassonville, C., Nicolis, I., Just, J., and Momas, I. (2011). Formaldehyde Exposure and Lower Respiratory Infections in Infants: Findings from the PARIS Cohort Study. *Environ. Health Perspect.* *119*, 1653–1658.
- Röder-Stolinski, C., Fischäder, G., Oostingh, G.J., Feltens, R., Kohse, F., von Bergen, M., Mörbt, N., Eder, K., Duschl, A., and Lehmann, I. (2008). Styrene induces an inflammatory response in human lung epithelial cells via oxidative stress and NF- κ B activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *231*, 241–247.
- Rose, R.L., and Hodgson, E. (2004). “Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles highlights aldehyde-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity” _ Song et al., 2015 DOI: 10.1016/j.tox.2015.06.007 Key words: microRNA, Aldehydes, Inflammation, Cytokine Category: IL6/IL8/MUC. In *A Textbook of Modern Toxicology*, E. Hodgson, ed. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 111–148.
- Rossner, P., Strapacova, S., Stolcpartova, J., Schmuczerova, J., Milcova, A., Neca, J., Vlkova, V., Brzicova, T., Machala, M., and Topinka, J. (2016). Toxic Effects of the Major Components of Diesel Exhaust in Human Alveolar Basal Epithelial Cells (A549). *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1393.
- Roy, J.W., Grapentine, L., and Bickerton, G. (2018). Ecological effects from groundwater contaminated by volatile organic compounds on an urban stream’s benthic ecosystem. *Limnologia* *68*, 115–129.
- Rumchev, K. (2004). Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax* *59*, 746–751.
- Saarikoski, S., Rivera, S., Hankinson, O., and Husgafvelpursiainen, K. (2005). CYP2S1: A short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *207*, 62–69.
- Saillenfait, A.M., Gallissot, F., Sabate, J.P., and Morel, G. (2005). Developmental toxicity of two trimethylbenzene isomers, mesitylene and pseudocumene, in rats following inhalation exposure. *Food Chem. Toxicol.* *43*, 1055–1063.
- Savary, C.C., Bellamri, N., Morzadec, C., Langouët, S., Lecureur, V., and Vernhet, L. (2018). Long term exposure to environmental concentrations of diesel exhaust particles does not impact the phenotype of human bronchial epithelial cells. *Toxicol. In Vitro* *52*, 154–160.
- Schindler, M. (2016). A QSAR for the prediction of rate constants for the reaction of VOCs with nitrate radicals. *Chemosphere* *154*, 23–33.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.
- Schupp, T., Georg, P.A., and Kirstein, G. (2017). Toxicological risk at workplace and toxicity as Life Cycle Assessment impact category: substitution of solvents as an example. *EXCLI J.* *16*Doc40 ISSN 1611-2156.
- SCOEL (1991). Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for benzene.
- SCOEL (1992). Recommendation from scientific expert group on occupational exposure limits for xylenes.
- SCOEL (1994). Recommendation from Scientific Expert Group on Occupational Exposure Limits for Trimethylbenzenes.
- Seeber, A., Sietmann, B., and Zupanic, M. (1996). In search of dose-response relationships of solvent mixtures to neurobehavioural effects in paint manufacturing and painters. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *34*, 1113–1120.

- Seinfeld, J.H., and Pandis, S.N. (2006). *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change* (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons).
- Sexton, K., Adgate, J.L., Mongin, S.J., Pratt, G.C., Ramachandran, G., Stock, T.H., and Morandi, M.T. (2004). Evaluating differences between measured personal exposures to volatile organic compounds and concentrations in outdoor and indoor air. *Environ. Sci. Technol.* *38*, 2593–2602.
- Shao, M.X.G., Nakanaga, T., and Nadel, J.A. (2004). Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor- α -converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *287*, L420–L427.
- Sheets, P.L., Yost, G.S., and Carlson, G.P. (2004). Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *18*, 92–99.
- Shimada, T., and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* *95*, 1–6.
- Singh, H.B., Tabazadeh, A., Evans, M.J., Field, B.D., Jacob, D.J., Sachse, G., Crawford, J.H., Shetter, R., and Brune, W.H. (2003). Oxygenated volatile organic chemicals in the oceans: Inferences and implications based on atmospheric observations and air-sea exchange models: OXYGENATED VOLATILE ORGANIC CHEMICALS IN THE OCEANS. *Geophys. Res. Lett.* *30*.
- Snyder, R., and Hedli, C.C. (1996). An overview of benzene metabolism. *Environ. Health Perspect.* *104 Suppl 6*, 1165–1171.
- Song, M.-K., Lee, H.-S., and Ryu, J.-C. (2015). Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles highlights aldehyde-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity. *Toxicology* *334*, 111–121.
- Svenningsen, S., Haider, E., Boylan, C., Mukherjee, M., Eddy, R.L., Capaldi, D.P.I., Parraga, G., and Nair, P. (2019). CT and Functional MRI to Evaluate Airway Mucus in Severe Asthma. *Chest* *155*, 1178–1189.
- Svensson, B.G., Nise, G., Erfurth, E.M., Nilsson, A., and Skerfving, S. (1992). Hormone status in occupational toluene exposure. *Am. J. Ind. Med.* *22*, 99–107.
- Swiercz, R., Wasowicz, W., and Majcherek, W. (2006). Mesitylene (1,3,5-Trimethylbenzene) in the Liver, Lung, Kidney, and Blood and 3,5-Dimethylbenzoic Acid in the Liver, Lung, Kidney and Urine of Rats after Single and Repeated Inhalation Exposure to Mesitylene. *Pol. J. Environ. Stud.* *15*, 485–492.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a016295–a016295.
- Tassaneeyakul, W., Birkett, D.J., Edwards, J.W., Veronese, M.E., Tassaneeyakul, W., Tukey, R.H., and Miners, J.O. (1996). Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m- and p-xylene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *276*, 101–108.
- Thatcher, T. (1995). Deposition, resuspension, and penetration of particles within a residence. *Atmos. Environ.* *29*, 1487–1497.
- Tomašek, I., Horwell, C.J., Bisig, C., Damby, D.E., Comte, P., Czerwinski, J., Petri-Fink, A., Clift, M.J.D., Drasler, B., and Rothen-Rutishauser, B. (2018). Respiratory hazard assessment of combined exposure to complete gasoline exhaust and respirable volcanic ash in a multicellular human lung model at the air-liquid interface. *Environ. Pollut.* *238*, 977–987.

- Tormoehlen, L.M., Tekulve, K.J., and Nañagas, K.A. (2014). Hydrocarbon toxicity: A review. *Clin. Toxicol.* *52*, 479–489.
- Totlandsdal, A.I., Øvrevik, J., Cochran, R.E., Herseeth, J.-I., Bølling, A.K., Låg, M., Schwarze, P., Lilleaas, E., Holme, J.A., and Kubátová, A. (2014). The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives and the proinflammatory potential of fractionated extracts of diesel exhaust and wood smoke particles. *J. Environ. Sci. Health Part A* *49*, 383–396.
- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 2563–2582.
- Upadhyay, S., and Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol. Sci.* *164*, 21–30.
- Uppstad, H., Øvrebø, S., Haugen, A., and Mollerup, S. (2010). Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol. Lett.* *192*, 221–228.
- Utell, M.J., and Frampton, M.W. (2000). Toxicologic methods: controlled human exposures. *Environ. Health Perspect.* *108*, 605–613.
- Václavíková, R., Hughes, D.J., and Souček, P. (2015). Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. *Gene* *571*, 1–8.
- Vales, G., Rubio, L., and Marcos, R. (2015). Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology* *9*, 568–578.
- Van Der Toorn, M., Sewer, A., Marescotti, D., Johne, S., Baumer, K., Bornand, D., Dulize, R., Merg, C., Corciulo, M., Scotti, E., et al. (2018). The biological effects of long-term exposure of human bronchial epithelial cells to total particulate matter from a candidate modified-risk tobacco product. *Toxicol. In Vitro* *50*, 95–108.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* *3*, research0034.1-research0034.11.
- Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., and Guidotti, M. (2006). Exposure to organic solvents among handicraft car painters: A pilot study in Italy. *Ind. Health* *44*, 310–317.
- Voynow, J.A., Gendler, S.J., and Rose, M.C. (2006). Regulation of Mucin Genes in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *34*, 661–665.
- Wang, J.D., and Chen, J.D. (1993). Acute and Chronic Neurological Symptoms Among Paint Workers Exposed to Mixtures of Organic Solvents. *Environ. Res.* *61*, 107–116.
- Wang, D., Nie, L., Shao, X., and Yu, H. (2017). Exposure profile of volatile organic compounds receptor associated with paints consumption. *Sci. Total Environ.* *603–604*, 57–65.
- Wang, F., Li, C., Liu, W., Jin, Y., and Guo, L. (2014). Effects of subchronic exposure to low-dose volatile organic compounds on lung inflammation in mice: Effects of Subchronic Exposure to VOCs. *Environ. Toxicol.* *29*, 1089–1097.
- Wang, Y., Bai, C., Li, K., Adler, K.B., and Wang, X. (2008). Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respir. Med.* *102*, 949–955.

- Waniusiow, D., Campo, P., Venet, T., Cossec, B., Cosnier, F., Beydon, D., Rieger, B., Burgart, M., Ferrari, L., and Parietti-Winkler, C. (2009). Toluene-Induced Hearing Loss in the Guinea Pig. *Toxicol. Sci.* *111*, 362–371.
- Weber, S., Hebestreit, M., Wilms, T., Conroy, L.L., and Rodrigo, G. (2013). Comet assay and air–liquid interface exposure system: A new combination to evaluate genotoxic effects of cigarette whole smoke in human lung cell lines. *Toxicol. In Vitro* *27*, 1987–1991.
- Weiss, J.N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* *11*, 835–841.
- Wiaderna, D., Gralewicz, S., and Tomas, T. (2002). Assessment of long-term neurotoxic effects of exposure to mesitylene (1,3,5-trimethylbenzene) based on the analysis of selected behavioral responses. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* *15*, 385–392.
- Win-Shwe, T.-T., and Fujimaki, H. (2010). Neurotoxicity of toluene. *Toxicol. Lett.* *198*, 93–99.
- Woiwode, W., Wodarz, R., Drysch, K., and Weichardt, H. (1979). Metabolism of Toluene in Man: gas-chromatographle Determination of o-, m- and p-Cresol in Urine. 93–98.
- Wolkoff, P., Wilkins, C.K., Clausen, P.A., and Nielsen, G.D. (2006). Organic compounds in office environments - sensory irritation, odor, measurements and the role of reactive chemistry. *Indoor Air* *16*, 7–19.
- Wong, B.A. (2007). Inhalation Exposure Systems: Design, Methods and Operation. *Toxicol. Pathol.* *35*, 3–14.
- Yoon, B.-I. (2002). Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Benzene-Induced Hematotoxicity. *Toxicol. Sci.* *70*, 150–156.
- Yu, M. (2002). The Role of Interleukin-6 in Pulmonary Inflammation and Injury Induced by Exposure to Environmental Air Pollutants. *Toxicol. Sci.* *68*, 488–497.
- Zhang, J., and Smith, K.R. (2003). Indoor air pollution: a global health concern. *Br. Med. Bull.* 209–225.
- Zhang, S., Li, X., Xie, F., Liu, K., Liu, H., and Xie, J. (2017). Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS–2B cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *54*, 40–47.
- Zhang, S., Chen, H., Wang, A., Liu, Y., Hou, H., and Hu, Q. (2019). Genotoxicity evaluation of carbon monoxide and 1,3-butadiene using a new joint technology: the *in vitro* γ H2AX HCS assay combined with air–liquid interface system. *Toxicol. Mech. Methods* *29*, 1–7.
- Zhou, W., Tian, D., He, J., Wang, Y., Zhang, L., Cui, L., Jia, L., Zhang, L., Li, L., Shu, Y., et al. (2016). Repeated PM2.5 exposure inhibits BEAS-2B cell P53 expression through ROS-Akt-DNMT3B pathway-mediated promoter hypermethylation. *Oncotarget* *7*, 20691–20703.
- Zscheppang, K., Berg, J., Hedtrich, S., Verheyen, L., Wagner, D.E., Suttorp, N., Hippenstiel, S., and Hocke, A.C. (2018). Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnol. J.* *13*, 1700341.

Etude en Interface Air-Liquide de la toxicité des Composés Organiques Volatils lors d'expositions répétées. Cas du toluène, de ses homologues et des émissions issues de son traitement catalytique.

Le toluène est un solvant fréquemment utilisé par l'industrie manufacturière. Il appartient à la catégorie des composés organiques volatils (COV), dont nombre d'entre eux présentent des impacts néfastes sur la santé humaine et sont aujourd'hui classés cancérigènes, mutagènes et/ou reprotoxiques. Afin de diminuer la présence dans l'air de composés nocifs comme le toluène, il apparaît essentiel d'envisager leur substitution dans les procédés industriels par des composés moins toxiques et/ou de réduire au maximum leurs émissions à la source. Dans ce contexte, le premier objectif du travail de recherche est d'étudier la toxicité aiguë et répétée du toluène, de ses homologues supérieurs, pouvant être utilisés comme composés de substitution, ainsi que de son homologue inférieur sur des cellules épithéliales bronchiques humaines à l'aide d'un dispositif d'exposition en interface air/liquide. Le deuxième objectif vise à évaluer le caractère toxique d'effluents gazeux issus de la dégradation du toluène par oxydation catalytique. Pour cela, les cellules BEAS-2B ont été exposées 1 heure par jour pendant 1, 3 et 5 jours au benzène, au toluène, au xylène ou au mésitylène, ainsi qu'aux effluents gazeux obtenus après traitement catalytique du toluène. Les effets toxiques ont été évalués au travers des paramètres de cytotoxicité, de réponse inflammatoire et d'expression génique des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX). L'exposition des cellules BEAS-2B au toluène et à ses homologues a révélé l'implication de voies métaboliques spécifiques à chaque composé. Une augmentation significative des marqueurs de l'inflammation a également été observée, avec une concentration plus importante pour le benzène et le xylène par rapport aux autres molécules. Concernant l'exposition aux effluents gazeux issus de l'oxydation catalytique du toluène, l'expression tardive de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques organiques aromatiques, est compatible avec la présence de sous-produits, tels que le benzène ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques. En conclusion, les résultats obtenus dans ce projet montrent l'intérêt de mener des expositions *in vitro* en condition répétée permettant de détecter de potentiels effets tardifs et la pertinence de la validation toxicologique des systèmes catalytiques avant leur formulation en pilote industriel.

Mots clefs : Toxicologie, Exposition en Interface Air-liquide, Composés Organiques Volatils, Expositions répétées

Study of Volatile Organic Compounds toxicity at Air-Liquid Interface during repeated exposure. Case of toluene, its homologous and outflow emissions after its catalytic treatment.

Toluene is a solvent widely used in manufacturing industries. It belongs to a family of volatile organic compounds (VOCs), many of which have adverse impacts on human health and are classified as carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction. Different measures have been implemented to reduce the emissions of toxic compounds, such as their replacement in the industry by less harmful compounds and/or reducing gas emissions at the source. In this context, the first objective of the research was to investigate the acute toxicity and the one after repeated exposure to toluene and its superior homologous solvents, which can be used as its substitution compounds, as well as its lower homologous on human bronchial epithelial cells using an air/liquid interface exposure device. The second objective was to assess the toxicity of gaseous effluents from the degradation of toluene by catalytic oxidation. For this purpose, BEAS-2B cells were exposed during 1 hour for 1, 3 or 5 days to benzene, toluene, xylene or mesitylene, and to the exhausts of catalytic oxidation of toluene. Toxic effects were evaluated through cytotoxicity, inflammatory response and gene expression of xenobiotic metabolism enzymes (XME). Exposure of BEAS-2B cells to toluene and its homologous compounds revealed the involvement of metabolic pathways specific to each compound. A significant increase in inflammatory marker response was also observed, with a higher concentration after cell exposure to benzene and to xylene compared to the other molecules. With regard to exposure to gaseous effluents from the catalytic oxidation of toluene, the late expression of genes involved in the metabolism of aromatic organic xenobiotics has made possible to highlight the presence of by-products, such as benzene or polycyclic aromatic hydrocarbons. In conclusion, the results obtained in this project show the interest of conducting repeated *in vitro* exposures to detect potential late effects, and the importance of toxicological validation of catalytic systems before scaling-up in industrial pilots.

Key words: Toxicology, Air-Liquid Interface Exposure, Volatile Organic Compounds, Repeated Exposures